

学位論文 博士 (工学)

血管内皮細胞および赤血球に対する光増感反応作用の
生体外実験系および光モニタリング技術

2018 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

浜田 梨沙

主論文要旨

主論文題目：

血管内皮細胞および赤血球に対する光増感反応作用の
生体外実験系および光モニタリング技術

(内容の要旨)

本研究の目的は、光感受性薬剤投与後早期における健常組織に対する光増感反応の治療応用において、治療における反応効率と血液系に生じる副作用に関わる血管内皮細胞と赤血球の酸化障害を主に *in vitro* で検討することにある。著者は、光増感反応による血管内皮細胞障害の相互作用を生体内において殺細胞効果に関わる周囲環境に注目して *in vitro* で調査し、*in vivo* における障害性と比較した。光増感反応中に赤血球膜破裂により遊離したヘモグロ빈は酸化作用を受けると予想し、励起光照射中の赤血球やヘモグロ빈の酸化進行を、反応効率を支配する溶存酸素量に関する情報と併せて経時的に測定する新たな光学的計測法 (*in vitro*) を提案した。

生体において血管内皮細胞が接している血液と間質液を想定した 2 種のアルブミン濃度における血管内皮細胞障害の放射照射量依存性を、細胞外光増感反応による殺細胞効果が支配的な *in vitro* 実験系を用いて死細胞率計測により調査した。光増感反応条件はタラポルフィンナトリウム 20 $\mu\text{g/mL}$ 、放射照射量 0-40 J/cm^2 を用いた。タラポルフィンナトリウム投与 30 min 後において、ビーグル犬の頸静脈内皮細胞に励起光を 9、35 J/cm^2 照射し、von Willebrand Factor 染色標本の血管内皮細胞と血小板の状態より急性期における血管内皮細胞障害を調査した。*in vivo* における血管内皮細胞の障害性は、*in vitro* 実験における血液中と間質液中相当のアルブミン濃度における障害性の間であった。薬剤投与後早期の励起光照射による健常血管内皮細胞の *in vivo* での障害性は、細胞外光増感反応が支配的な殺細胞効果をもつ *in vitro* 実験系を用いて 2 種のアルブミン濃度での障害性を検討することが有効であることが分かった。

著者は、酸化および酸素脱着により可視波長領域において各々特徴的な吸収スペクトルを有するヘモグロ빈分光に着目し、光増感反応による赤血球破裂およびヘモグロ빈の酸化進行を酸素情報と併せて経時的に測定可能な計測法を提案した。波長 663 nm の励起レーザ光と波長 475-650 nm の吸収スペクトル測定光の光軸を血液試料上で直交するよう配置し、励起光照射中に可視透過スペクトルを連続測定した。得られた吸収スペクトルに対し重回帰分析を用いて各種ヘモグロ빈濃度を算出したところ、照射時間に伴い、反応による酸素消費と考えられる酸素化ヘモグロ빈濃度の減少および脱酸素化ヘモグロ빈濃度の増加、酸化進行と考えられるメトヘモグロ빈濃度の増加を得た。血液試料溶液のヘマトクリット増加は、溶液中の溶存酸素量の増加を示していた。この結果は光増感反応を用いた *in vitro* 実験において懸念されている、励起光照射中の溶液内酸素不足に対し

て、溶液への赤血球添加により溶存酸素量を化学的に増やせることを示唆した。提案計測法で取得した酸素飽和度と酸素電極法により取得した酸素分圧変化を比較したところ、反応効率に関わる低酸素分圧領域において両者は高い相関を示した。メトヘモグロビン濃度と溶血度の関係は、破裂した赤血球内のヘモグロビンのほぼ全量が酸化作用を受けメトヘモグロビンに変化していることを示した。これらの結果より、著者の発案した計測法は、光増感反応中の溶液内の赤血球破裂およびヘモグロビンの酸化進行を酸素情報とともに測定できることが分かった。

以上より、本研究で用いた *in vitro* 基礎実験法は、薬剤投与後早期の健常組織に対する細胞外光増感反応を用いた治療において、生体環境における血管および血液まわりの障害性を検討できる基礎実験法となり得る。

SUMMARY OF Ph.D. DISSERTATION

Title

In vitro system and optical monitoring techniques to investigate oxidative damages of vascular endothelium and red blood cells by a photosensitization reaction

Abstract

The author studied oxidative damages of vascular endothelium and red blood cells by a photosensitization reaction *in vitro* to investigate the reaction efficacy and side effect against these cells using the condition with novel photosensitizer, talaporfin sodium, almost distributed outside cells. An acute lethality of the vascular endothelium cell by the reaction was investigated *in vitro* arranging albumin concentrations match to the vascular endothelium cell surroundings. To investigate the red blood cell membrane damage during the reaction continuously, the author proposed a sophisticated optical system to measure blood sample visible absorption spectra.

We used two different albumin concentrations in the acute damage experiment with the vascular endothelium cells *in vitro* to match those in blood and interstitial of the vascular wall. Other conditions in this experiment altered within proposed photodynamic therapy conditions with a short drug-light-interval. While, canine cervical veins were irradiated 30 min after talaporfin sodium intravenous injection with 9 and 35 J/cm² *in vivo*. The damages of endothelium cells in these veins were evaluated with the endothelium cell figure and platelet aggregation by the specimen observation extracted 30 min after the reaction. The obtained damages *in vivo* were existed between the damages of two kinds of albumin *in vitro*. The author found usefulness of the proposed *in vitro* system using two different albumin concentrations to estimate the *in vivo* damage of the vascular endothelium cells in the healthy tissue by the reaction with the short drug-light-interval.

To investigate the red blood cell damage by the photosensitization reaction for the safety assessment of the above mentioned particular photodynamic therapy, the author designed an optical monitoring system to measure hemoglobin oxidation and oxygen desorption dynamics by absorption spectrum measurement during the reaction. A 663 nm wavelength laser beam to excite the reaction and a 475-600 nm wavelength light beam to measure visible absorption spectrum were arranged perpendicularly crossing in a blood optical sample. Oxygenated-, deoxygenated-, and met- hemoglobin quantities were calculated by multiple regression analysis against the measured spectrum. The met-hemoglobin

concentration increased and oxygen saturation decreased with irradiation time, which seems to indicate the hemolysis progression and oxygen consumption by the reaction, respectively. Increasing hematocrit of the blood sample indicated pro-long of the reaction term until an oxygen depletion. The author thought that this result suggested the possibility of improving *in vitro* study for the photosensitization reaction, in which the oxygen shortage tends to occur. Oxygen pressure changes in the medium obtained by our proposing optical system showed good agreement to conventional oxygen electrode measurement especially in the low oxygen environment. The relationship between the met-hemoglobin concentration and hemolysis degree indicated that almost all hemoglobin in the ruptured red blood cell immediately got oxidative reaction and changed to met-hemoglobin. From these results, proposing optical monitoring system could obtain the hemolysis progression with dissolved oxygen information during the irradiation simultaneously with time.

The author thinks the proposing *in vitro* systems for vascular endothelium cell and red blood cells seems to be useful method/system to estimate the damage around the blood vessel and blood in clinical situation of the photodynamic therapy with short drug-light-interval.

目次

第1章 序論	1
1.1 緒言	1
1.2 本研究の目的と背景	1
1.3 本論文の構成	4
1.4 結言	5
参考文献	6
図表	8
第2章 光増感反応による治療	9
2.1 緒言	9
2.2 光増感反応	9
2.2.1 反応機構	9
2.2.2 光感受性薬剤	10
2.2.3 細胞内外の光感受性薬剤分布と光増感反応作用	11
2.3 光増感反応を利用した治療	13
2.3.1 腫瘍組織に対する細胞内光増感反応	13
2.3.2 新生血管内皮に対する光増感反応	14
2.3.3 菌類に対する細胞外光増感反応	14
2.3.4 健常心筋組織に対する細胞外光増感反応	16
2.4 結言	16
参考文献	17
図表	22
第3章 血管内皮細胞と光増感反応による障害	27
3.1 緒言	27
3.2 血管の構造	27
3.3 血管内皮細胞	28
3.3.1 血管内皮細胞の機能	28
3.3.2 血管内皮細胞の障害	29
3.4 光線力学的治療における血管内皮細胞障害の影響	30
3.5 短時間薬剤接触の光増感反応による健常組織血管内皮細胞障害の検討法の提案	31
3.6 結言	32

参考文献	33
図表	35
第4章 赤血球と光増感反応による障害	38
4.1 緒言	38
4.2 血液と赤血球の組成	38
4.3 ヘモグロビン	39
4.3.1 ヘモグロビンの構造	39
4.3.2 ヘモグロビンの酸素運搬能	41
4.3.3 ヘモグロビンの光学特性	43
4.4 溶血	43
4.4.1 溶血発生機序	43
4.4.2 溶血度測定方法	44
4.4.3 光線力学的治療における溶血の影響	45
4.5 赤血球に対する光増感反応作用の <i>in vitro</i> 光学測定系の提案	45
4.6 結言	46
参考文献	47
図表	50
第5章 血管内皮細胞に対する光増感反応作用の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 検討	64
5.1 緒言	64
5.2 血管内皮細胞の細胞内光感受性薬剤蓄積量 <i>in vitro</i> 実験	64
5.2.1 実験方法	64
5.2.2 実験結果	65
5.3 種々のアルブミン濃度における細胞外光増感反応による血管内細胞障害 <i>in vitro</i> 実験	65
5.3.1 実験方法	65
5.3.2 実験結果	67
5.4 薬剤投与後早期の健常血管への光増感反応による血管内皮細胞障害 <i>in vivo</i> 実験	67
5.4.1 実験方法	68
5.4.2 実験結果	69
5.5 考察および Limitation	69
5.6 結言	70
参考文献	71
図表	72

第 6 章 赤血球に対する光増感反応作用 <i>in vitro</i> 検討における連続計測装置の開発	81
6.1 緒言	81
6.2 透過吸収スペクトル測定のための血液試料のヘマトクリット値選定	81
6.2.1 実験方法	81
6.2.2 実験結果および考察	82
6.3 血液試料における各種ヘモグロビン濃度の光増感反応条件依存性	83
6.3.1 実験方法	83
6.3.1.1 血液試料の吸収スペクトル測定	83
6.3.1.2 実測吸収スペクトルに対する重回帰分析	83
6.3.2 実験結果および考察	84
6.4 提案計測法に基づく連続計測装置の構築	85
6.4.1 設計	85
6.4.2 吸収スペクトル測定系の精度検討	86
6.4.3 提案計測法に対する計測・反応条件の影響	87
6.4.3.1 光感受性薬剤接触による影響	87
6.4.3.2 吸収スペクトル測定による影響	88
6.5 光増感反応進行中の各種ヘモグロビン濃度動態	89
6.5.1 実験方法	89
6.5.2 実験結果および考察	89
6.6 結言	90
参考文献	92
図表	94
第 7 章 提案計測法によって得られる酸素情報	119
7.1 緒言	119
7.2 ヘマトクリット値を変化させたときの酸素供給動態	119
7.2.1 実験方法	119
7.2.2 実験結果および考察	119
7.3 酸素分圧換算に用いるヘモグロビンの酸素解離曲線	121
7.3.1 実験方法	121
7.3.2 実験結果	121
7.3.3 試料条件に対応するヘモグロビン酸素解離曲線	123
7.4 酸素電極法による酸素分圧測定	123
7.4.1 実験方法	123
7.4.2 実験結果	124

7.5 考察	124
7.6 結言	124
参考文献	125
図表	126
第 8 章 提案計測法によって得られる酸化動態	140
8.1 緒言	140
8.2 メトヘモグロビン濃度と溶血度の関係	140
8.2.1 実験方法	140
8.2.2 実験結果および考察	141
8.3 励起光照射による光感受性薬剤蛍光量動態	142
8.3.1 実験方法	142
8.3.2 実験結果および考察	142
8.4 アルブミン添加赤血球混濁液の反応進行	144
8.4.1 実験方法	144
8.4.2 実験結果および考察	144
8.5 結言	145
参考文献	146
図表	147
第 9 章 総括的討論：光増感反応を用いた治療における血管まわりの酸化作用 検討法	154
9.1 緒言	154
9.2 薬剤投与後早期の健常組織血管内皮細胞に対する光増感反応による酸化障害検討	154
9.3 赤血球混濁液における反応進行の推定	155
9.4 提案計測法の応用	156
9.4.1 溶血安全性評価	156
9.4.2 光増感反応を用いた <i>in vitro</i> 実験法における酸素環境向上	157
9.4.3 光感受性薬剤の性能評価	157
9.4.4 提案計測法の応用における Limitation	157
9.5 結言	158
参考文献	159
図表	160
第 10 章 結論	162

付録	164
A 光照射および光計測に関する用語および記号説明	164
A.1 用語説明	164
A.2 記号説明	164
B 生体の光学特性の表示法	165
C 本研究結果を用いた生体環境における溶血発生リスクの見積もり	167
参考文献	168
著者論文目録	169
謝辞	

図表の目次

図 1-1	本論文の構成
図 2-1	光増感反応におけるエネルギーダイアグラム
表 2-1	種々の光感受性薬剤とその特徴
図 2-2	ポルフィマーナトリウムの化学構造
図 2-3	タラポルフィンナトリウムの化学構造
図 2-4	ベルテポルフィンの化学構造
図 3-1	血管内皮細胞障害機序の模式図
図 3-2	血管内皮細胞障害による血栓形成の様子
図 3-3	血管内皮細胞周辺の光増感反応に関与する要素の状態
表 4-1	血漿の組成
表 4-2	全血、血漿、赤血球の物理化学的性質
表 4-3	赤血球の形態に関する基準値
表 4-4	赤血球の主要構成成分
図 4-1	ヘムの構造
図 4-2	酸素結合によるヘモグロビンの構造変化
図 4-3	ヘモグロビンの酸素解離曲線
図 4-4	ミオグロビンの酸素解離曲線
図 4-5	ヘモグロビンの吸収スペクトル
図 4-6	赤色波長および近赤外波長における酸素化ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビンの吸収スペクトル
表 4-5	溶血安全性評価表
図 4-7	細胞膜の基本構造
図 4-8	早期肺癌患者にタラポルフィンナトリウムを 40 mg/m ² (1mg/kg) 静脈投与したときの血漿中タラポルフィンナトリウムおよび総クロリン濃度変化
図 4-9	光増感反応環境下における赤血球障害の予想図
図 5-1	細胞内蛍光量計測における顕微鏡画像 (a) 明視野画像、(b) 蛍光画像
図 5-2	血管内皮細胞内のタラポルフィンナトリウム由来の平均蛍光輝度の薬剤接触時間依存性

図 5-3	血管内皮細胞に対する光増感反応作用系
図 5-4	4 ウェルに照射したときの励起レーザ光の光強度分布
図 5-5	WST-8 の反応機構
図 5-6	WST-8 ホルマザンの吸収スペクトル
図 5-7	各放射照射量およびアルブミン濃度における血管内皮細胞障害の薬剤接触時間依存性
図 5-8	各放射照度およびアルブミン濃度における血管内皮細胞障害の放射照射量依存性
図 5-9	イヌ頸静脈に対して血管外から励起レーザ光照射を行ったときの血管内側の von Willebrand Factor 染色画像
図 6-1	生理食塩水を溶媒として作製したタラポルフィンナトリウム溶液の吸収スペクトル
図 6-2	(a) 作成した血液試料の模式図、(b) 血液試料への励起レーザ光照射系
図 6-3	各ヘマトクリット値の血液試料における光増感反応前の吸収スペクトル
図 6-4	各ヘマトクリット値の血液試料における光増感反応後の吸収スペクトル
図 6-5	光増感反応前後での各ヘマトクリット値の血液試料の吸収スペクトル測定における波長 475-600 nm での変動係数の平均値
表 6-1	式 (6.2) における各変数の説明
図 6-6	光感受性薬剤濃度を变化させたときの血液試料の吸収スペクトル
図 6-7	放射照射量を変化させたときの血液試料の吸収スペクトル
図 6-8	光感受性薬剤濃度を变化させたときの血液試料の各種ヘモグロビン濃度
図 6-9	放射照射量を変化させたときの血液試料の各種ヘモグロビン濃度
図 6-10	タラポルフィンナトリウムの Q 帯波長域を含む 600-700 nm における血液試料の吸収スペクトル
図 6-11	血液試料の 600-700 nm 帯におけるピーク値とその時の波長の放射照射量依存性
図 6-12	タラポルフィンナトリウムを含む赤血球混濁液と溶血試料の吸収スペクトル
図 6-13	励起レーザ光照射中の血液試料の吸収スペクトルを経時計測可能な構築実験系の模式図
図 6-14	構築実験系における血液試料周囲の光学配置
図 6-15	構築した実験系の写真
図 6-16	連続計測装置における励起レーザ光強度分布
図 6-17	2つのフィルターを用いて波長域を 470-650 nm に選定した連続計測系における吸収スペクトル測定光のスペクトル

図 6-18	薬剤接触時間を変化させたときの血液試料の吸収スペクトル
図 6-19	薬剤接触時間を変化させたときの血液試料の各種ヘモグロビン濃度
図 6-20	薬剤接触時間を変化させたときのタラポルフィンナトリウム Q 帯波長域における赤血球内溶液の吸光度のピーク値
図 6-21	血液試料に含まれるタラポルフィンナトリウムの Q 帯波長域における励起レーザ光と吸収スペクトル測定光の関係
図 6-22	構築した実験系を用いた励起レーザ光照射中の血液試料の吸収スペクトル測定結果
図 6-23	提案計測法による励起レーザ光照射中の血液試料の各種ヘモグロビン濃度算出結果
図 6-24	タラポルフィンナトリウムを含まない血液試料の各種ヘモグロビン濃度変化
図 7-1	励起レーザ光照射中における血液試料 A の吸収スペクトル
図 7-2	励起レーザ光照射中における血液試料 B の吸収スペクトル
図 7-3	励起レーザ光照射中の血液試料 A および B の酸素化ヘモグロビン濃度および酸素飽和度変化
図 7-4	励起レーザ光照射中の光学試料 A および B の各種ヘモグロビン濃度および酸素飽和度変化
図 7-5	血液試料 A の励起レーザ光照射中の時刻 $(t+5)$ [s] と時刻 t [s] における酸素化ヘモグロビン濃度の差の一例
表 7-1	血液試料 A および B の 3 つの相に対応する励起レーザ光照射時間
図 7-6	励起レーザ光照射中における血液試料の温度計測系の配置
図 7-7	励起レーザ光照射中における血液試料内容液の pH 計測系の配置
図 7-8	励起レーザ光照射中における血液試料内溶液の温度変化
図 7-9	励起レーザ光照射中における血液試料内溶液の pH 変化
図 7-10	励起レーザ光照射中における血液試料内溶液の温度、pH を考慮したヘモグロビン酸素解離曲線
図 7-11	励起レーザ光照射中における血液試料内溶液の酸素電圧計測系の配置
図 7-12	励起レーザ光照射中における血液試料内溶液の酸素分圧変化
図 7-13	励起レーザ光照射中の血液試料における提案計測法より取得した酸素飽和度から推定した酸素分圧と酸素電極法により実測した酸素分圧の変化
図 8-1	励起レーザ光照射時間における血液試料の上清吸光度より算出した溶血度
図 8-2	提案計測法より取得したメトヘモグロビン濃度に対する試料の上清吸光度より算出した溶血度の関係

図 8-3	励起レーザ光照射中の血液試料の波長 670 nm 帯の拡散蛍光スペクトルの一例
図 8-4	励起レーザ光照射中の血液試料の波長 667.8-674.4 nm における分光器検出拡散蛍光カウントの総和
図 8-5	各放射照射量の励起レーザ光照射後における血液試料の写真
図 8-6	励起レーザ光照射中のタラポルフィンナトリウム溶液の波長 667.8-674.4 nm における分光器検出拡散蛍光カウントの総和
図 8-7	励起レーザ光照射中におけるアルブミン濃度 2.1 mg/mL の血液試料の各種ヘモグロビン濃度および酸素飽和度変化
表 9-1	本研究と類似研究の比較
図 9-1	提案計測法で明らかになった赤血球混濁液内の反応進行

第 1 章 序論

1.1 緒言

本研究の目的は光感受性薬剤投与後早期 (15-60 min, 2.3.4 節参照) における健常組織に対する光増感反応の治療応用において、治療における反応効率と血液系に生じる副作用に関わる血管内皮細胞と赤血球の酸化障害を主に *in vitro* で検討することにある。

光増感反応による酸化力を利用した光線力学的治療は、種々の腫瘍組織に対する選択的で低侵襲な治療法として知られており、近年では腫瘍組織以外の疾病への応用が検討されている [1-5]。光線力学的治療では、光感受性薬剤を静脈投与し患部へ励起光照射を行うことで、励起薬剤のエネルギーが組織内の酸素へ移乗して一重項酸素を産生し、その酸化作用により腫瘍組織の壊死を得る [1]。薬剤が存在する血管および血液に励起光が当たるため、血流量低下に関わる血管内皮細胞障害や酸素供給不足に関わる赤血球障害が生じる可能性がある。光増感反応速度は酸素濃度に依存するため、組織の酸素不足は不完全な治療につながる。また周囲にある重要血管の障害や過度な赤血球障害は副作用につながる。腫瘍組織に対する光線力学的治療では血管や血液の障害に関して基礎から臨床に至る多くの研究報告があるが、腫瘍組織以外を対象とした治療では薬剤接触時間、血管内皮細胞の成熟度、血流速など光増感反応に関する環境が大きく異なるため、治療開発にはさらなる相互作用の検討が必要である。著者は、光線力学的治療において治療効果と副作用に関わる血管内皮細胞や赤血球の障害に関して生体環境をふまえた検討を行う。具体的には、光増感反応による血管内皮細胞障害の光照射条件や反応効果に影響を及ぼす周囲環境要素への依存性を *in vitro* にて調査し、*in vivo* 実験における障害性と比較検討する。光増感反応による赤血球膜の破裂を赤血球内部に含まれるヘモグロビンの酸化に注目し、*in vitro* 基礎実験における新たな計測法を提案し、励起光照射中の赤血球やヘモグロビンの酸化進行に関して反応効率を支配する溶存酸素量に関係する情報と併せて経時的に明らかにする。

1.2 本研究の目的と背景

光増感反応とは光により励起された光感受性薬剤が周囲に存在する酸素にエネルギーを移乗する結果、酸化力の強い一重項酸素を産生する光化学反応である [1, 2]。この一重項酸素の酸化力を生体組織に対して作用させると殺細胞効果が得られ、これを利用した治療法を光線力学的治療と呼ぶ [1]。光線力学的治療は早期肺癌、表在性食道癌、表在性早期胃癌、子宮頸部初期癌および異形成に対する低侵襲な治療法として日本で 1994 年に認可を受けて以来、2004 年に加齢黄斑症、2013 年に原発性悪性脳腫瘍、2015 年に化学放射線療法又は放射線療法後の局所遺残再発食道癌が認可され、現在は感染症や心房細動など腫瘍組織以外の疾病への応用が検討されている [2-6]。癌に対する光線力学的治療では腫瘍組織が健

常組織に比べて光感受性薬剤の排泄性が低いことを利用し、薬剤の静脈投与から患部への励起光照射までの時間を適切に設定することで腫瘍組織と健常組織における薬剤濃度のコントラストを作り、選択的な治療を実現している。治療の励起光照射時に生体内に存在している光感受性薬剤のほとんどは腫瘍細胞内に取り込まれており、ミトコンドリアやライソソームなどの細胞内小器官が障害されることにより遅発性のアポトーシスが誘導される [1]。一方、腫瘍組織以外を対象とする感染症や不整脈に対する治療法では、薬剤濃度のコントラストが生じないため薬剤投与後コントラスト生成までの時間を待つ必要がない。そのため薬剤が高濃度で細胞の周辺や膜に存在する薬剤投与後早期に励起光照射を行い、細胞膜障害によるネクローシスを誘導する [1, 4, 5]。腫瘍組織に対する光線力学的治療においては基礎検討から臨床研究に至る多くの研究があるが、腫瘍組織以外を対象とする治療法の開発には相互作用のさらなる基礎検討が必要である [1, 7]。

光感受性薬剤は一般に静脈投与され血流によって対象組織に送達されるため、患部への励起光照射時には血液中や血管内皮細胞に薬剤が存在する [8]。薬剤が存在する血管に励起光が当たると、血管内皮細胞や赤血球膜が障害される可能性がある。血管の内側を覆う血管内皮細胞は、血液中にある成分が血管壁内部へ侵入するのを防ぐバリア機能としての役割や種々の生理活性物質を産生して血流、血圧、血小板活性の調整など多岐にわたって体の恒常性を維持する役割を担う [9]。血管内皮細胞が障害を受けると、バリア機能が崩壊し浮腫が発生することや、抗血栓作用が喪失し血小板凝集が起こることで血流低下や血管閉塞を起こす恐れがある。光増感反応に必要な酸素は血流により供給されるため、血流低下や血管閉塞は光増感反応効率を低下させ十分な反応速度が得られない可能性がある。すなわち治療においては不十分な治療効果につながる可能性が考えられる。また周囲に重要血管が存在する場合はその保存性を担保する必要がある。癌に対する光線力学的治療では、治療領域内において血管閉塞が生じることが報告されている [1, 10-13]。腫瘍組織においては、治療後における血管閉塞は腫瘍組織の壊死効果の一因と考えられている。しかし、治療の励起光照射中における血管閉塞は不完全な治療につながる [13]。腫瘍組織以外を対象とする光線力学的治療では、短い薬剤接触時間で細胞障害を起こしており、対象組織における血管内皮細胞の成熟度や血流速などが腫瘍組織と異なるため、血管内皮細胞の障害性を新たに検討する必要がある [1, 8, 11, 14]。薬剤投与後早期の時点では、血管内皮細胞周囲の光感受性薬剤は細胞内に存在するよりもアルブミン濃度がそれぞれ異なる血液中もしくは血管壁に主に存在していると考えられる。タラポルフィンナトリウムはヒト血清蛋白質であるアルブミンと高い結合親和性をもち、アルブミン濃度が上昇すると遊離薬剤割合が減少し光増感反応による殺細胞効果が減弱することが報告されている [15]。これは光増感反応により産出される一重項酸素が組織に対してではなく、結合しているアルブミンへの酸化に消費されるためである。著者は、光増感反応による血管内皮細胞の障害を、薬剤接触時間とアルブミン濃度に注目し *in vitro* 実験にて調査した。併せて、タラポルフィンナトリウム投与後早期

に励起光照射を行った際の *in vivo* における急性期 (30 min) の障害性を、血管内皮細胞の有無と血小板凝集に着目し von Willebrand Factor 染色の標本観察により調査し、*in vitro* 結果と比較した。

光増感反応に必要な酸素の運搬担体であるヘモグロ빈を内包する赤血球の膜に光増感反応による酸化作用が及ぶと、赤血球膜が破れヘモグロ빈が血液中に遊離し溶血が発生する。赤血球内部から遊離したヘモグロ빈は光増感反応による酸化作用を受け、酸素運搬能力がないメトヘモグロ빈に変性すると考えられる。酸素運搬担体である酸素化ヘモグロ빈数が減少すると励起光照射体積内における酸素量が減少し、光線力学的治療中における血流量低下や血管閉塞と同じく不十分な治療効果につながる可能性が考えられる。また、過度な溶血が生じた場合は急性腎不全や貧血の原因になる [16]。生体環境では血流や処理機構などが関わり相互作用の検討が困難であることから、溶血の安全性評価は *in vitro* 実験が標準法として定められている。標準法では、容器内の血液試料に対して作用を起こし作用後の血液試料に対して、上澄み液の吸光度もしくは自動血球計数装置による血球数の測定により溶血発生度を算出する [6, 17]。光線力学的治療における溶血安全性は、この *in vitro* 実験の結果を基に組織血流量を勘案して計算により評価される。癌に対する治療では、腫瘍組織の組織血流量は少なく励起光照射体積も小さいため、全身状態に影響を及ぼすような重度な溶血は発生しないとされている。一方で、近年開発が進んでいる癌以外に対する治療では組織血流量や照射体積などの状況が異なり影響を受ける血液量が増すため、光増感反応が赤血球やヘモグロ빈に及ぼす酸化作用を詳細に検討する必要がある。*in vitro* 実験で光増感反応を起こすと、溶存酸素濃度が限られている反応容器内の溶液中で酸素消費速度の速い反応が起こるため、励起光照射中に溶液内の酸素が減少し枯渇が生じることが報告されている [18, 19]。光増感反応は、酸素、光感受性薬剤の存在下に励起光が照射されて生じる反応であるため、酸素濃度の減少は反応効率を低下させる。したがって光増感反応を用いる *in vitro* 実験において光増感反応作用量を正確に評価し、血流により酸素供給が豊富に行われる生体環境での作用を検討可能な実験を行うためには、溶液への酸素供給を増すか溶液酸素濃度の経時測定を用いた補正が必要である。溶液に酸素を供給する手法は人工赤血球を始め人工肺で用いられるバブリング法やシリコン膜を用いた拡散法など種々の研究が行われてきたが、未だに十分な供給ができる簡便な手法は確立されていない。基礎研究において溶液酸素濃度の測定は酸素電極による酸素分圧測定が一般に行われるが、励起レーザー光照射を伴う光増感反応の実験では照射光による外乱が多い [13, 18, 19]。赤血球内の主要タンパク質であるヘモグロ빈は周囲の酸素状況に応じて酸素と着脱し組織へ酸素を運搬する重要な担体である [20]。ヘモグロ빈との結合により化学的に溶存している酸素は血漿中の溶存酸素の約 60 倍であり、血液が運搬する酸素の大部分はヘモグロ빈と結合している [21]。酸素脱着によるヘモグロ빈の可視・近赤外領域における吸収スペクトル変化を利用し酸素飽和度を測定する方法は、無侵襲かつ連続的な測定法で知られるパルスオ

キシメータとして医療現場で広く用いられている [21, 22]。組織の酸素分圧とそれに応じた酸素飽和度の関係は酸素解離曲線として報告されており、血液試料の pH と温度に応じたヘモグロビンの酸素解離曲線を参照すると酸素飽和度を酸素分圧に変換できる [24]。現行の溶血安全性評価に関する *in vitro* 実験の標準法では、酸素消費による光増感反応効率の低下を考慮しておらず、さらに間欠的な実験法であるため、種々の状況に応じた光増感反応作用量に対する溶血発生の関係を正確に評価することができないと考える。メトヘモグロ빈は赤血球膜破裂による遊離ヘモグロビンの発生量に応じた酸化産物であり、酸素化ヘモグロビンと脱酸素化ヘモグロビンを識別可能な可視波長領域において両ヘモグロビンに対して特徴的な吸収スペクトルを持つ [25]。そこで著者は可視領域の吸収スペクトル測定に注目し、メトヘモグロビンの産生量を酸素飽和度と併せて検出することで、光増感反応による赤血球膜破裂およびヘモグロビンの酸化進行を溶存酸素濃度に関係する情報と併せて経時的に測定可能な計測法を提案する。

以上要するに著者は、光線力学的治療の基礎検討として反応に必要な酸素および光感受性薬剤の運搬を担う血管と血液が励起光照射により受ける影響、具体的には血管内皮細胞や赤血球の障害に関して検討する。

1.3 本論文の構成

本論文は 10 章から構成される。図 1-1 に本論文の構成を示す。

本章では、光増感反応を用いた治療における血管内皮細胞障害と溶血を検討する本研究の背景を述べた。

第 2 章では、光増感反応の原理とこの反応を用いた治療について述べた。

第 3 章では、血管内皮細胞の生理学に関して説明し、光増感反応を用いた治療における血管内皮細胞障害が治療効果に及ぼす影響に関して述べた。そして、薬剤投与後早期 (15-60 min) の健常組織に対する光増感反応を用いた治療における血管内皮細胞障害の *in vitro* 基礎検討法の提案を行った。

第 4 章では、ヘモグロビンをはじめとする血液に関する生理学について説明し、溶血発生の影響に関して述べた。そして、現行の溶血度安全性評価法の課題を示し、溶血進行を反応効率に関わる溶液内酸素分圧と共に経時的に測定可能な光学的計測法の提案を行った。

第 5 章では、タラポルフィンナトリウム投与後早期における健常組織血管に対する光増感反応を用いた治療での血管内皮細胞障害を (i) *in vitro* における死細胞率計測、(ii) *in vivo* における標本観察、により実験的に調査し、(i) と (ii) の実験の対応を検討した。

第 6 章では、光増感反応による赤血球膜破裂およびヘモグロビンの酸化進行を、反応速度を支配する酸素の情報と併せて経時的に明らかにする計測系の構築を行い、励起光照射中の血液試料の各種ヘモグロビン濃度変化を明らかにした。

第 7 章では、異なるヘマトクリット値の血液試料における酸素化ヘモグロビン濃度変化や、

酸素飽和度と酸素電極法により求めた酸素分圧変化より、提案計測法で得られる溶存酸素濃度に関する情報の妥当性を検討した。

第 8 章では、提案計測法により得られる酸化進行に着目し、メトヘモグロビン濃度と溶血度との関係や光感受性薬剤の退色を検討した。また、光増感反応の酸化作用効率に関わるアルブミンを加えたときの各種ヘモグロビン濃度変化を調査した。

第 9 章では、第 5 章から第 8 章で得られた知見に関して総括的な検討を加えた。薬剤投与後早期の健常組織を対象とした光増感反応を用いた治療における血管内皮細胞や赤血球の酸化障害の基礎検討として、本研究で提案した *in vitro* 基礎検討法の有用性に関して論じた。

第 10 章は、本研究の結論である。

1.4 結言

本章では、光増感反応を用いた治療における血管内皮細胞障害と溶血を検討する本研究の背景を述べ、本論文全体の構成をまとめた。

参考文献

- [1]□ B. W. Henderson and T. J. Dougherty, “How does photodynamic therapy work?,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 55, pp. 145-157, 1992.
- [2]□ S. B. Brown, E. A. Brown, and I. Walker, “The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment,” *Lancet Oncol.*, vol. 5, pp. 497-508, 2004.
- [3]□ ノバルティスファーマ株式会社, ビスダイン® 静注用 15 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2016 年 6 月改訂 (第 8 版).
- [4]□ M. R. Hamblin and T. Hasan, “Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 3, pp. 436-450, 2004.
- [5]□ T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, K. Fukumoto, M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Arai, S. Ogawa, and K. Fukuda, “Nonthermal cardiac catheter ablation using photodynamic therapy,” *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.*, vol. 6, pp. 1025-1031, 2013.
- [6]□ Meiji Seika ファルマ株式会社, 注射用レザフィリン® 100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2016 年 6 月改訂 (第 10 版).
- [7]□ D. E. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, “Photodynamic therapy for cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, pp. 380-387, 2003.
- [8]□ C. J. Gomer and A. Ferrario, “Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model,” *Cancer Res.*, vol. 50, pp. 3985-3990, 1990.
- [9]□ 岡嶋研二, 血管内皮細胞障害の臨床へのアプローチ 東京: 総合医学社, 1998, pp. 1-36.
- [10]□ M. W. Reed, F. N. Miller, T. J. Wieman, M. T. Tseng, and C. G. Pietsch, “The effect of photodynamic therapy on the microcirculation,” *J. Surg. Res.*, vol. 45, pp. 452-459, 1988.
- [11]□ W. M. Star, H. P. Marijnissen, A. E. van den Berg-Blok, J. A. Versteeg, K. A. Franken, and H. S. Reinhold, “Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers,” *Cancer Res.*, vol. 46, pp. 2532-2540, 1986.
- [12]□ J. S. Nelson, L. H. Liaw, A. Orenstein, W. G. Roberts, and M. W. Berns, “Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, and phthalocyanine,” *J. Natl. Cancer I.*, vol. 80, pp. 1599-1605, 1988.
- [13]□ B. J. Tromberg, A. Orenstein, S. Kimel, S. J. Barker, J. Hyatt, J. S. Nelson, and M. W. Berns, “In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 52, pp. 375-385, 1990.
- [14]□ P. Vaupel, F. Kallinowski, and P. Okunieff, “Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review,” *Cancer Res.*, vol. 49, pp. 6449-6465, 1989.

- [15] L. Sheyhedin, K. Aizawa, M. Araake, H. Kumasaka, T. Okunaka, and H. Kato, “The effects of serum on cellular uptake and phototoxicity of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6) *in vitro*,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 68, pp. 110-114, 1998.
- [16] 野村武夫, 古沢新平, 長尾大, *図解 血球生理・病態・臨床 赤血球*, 東京: 中外医学社, 1994, pp. 19-67.
- [17] 厚生労働省医薬食機発 0301 第 20 号, “医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について,” 平成 24 年 3 月 1 日発行.
- [18] M. J. Niedre, A. J. Secord, M. S. Patterson, and B. C. Wilson, “In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy,” *Cancer Res.*, vol. 63, pp. 7986-7994, 2003.
- [19] E. Ogawa, A. Ito, T. Arai, “Detailed in vitro study of the photosensitization reaction of extracellular talaporfin sodium in rat myocardial cells,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 45, pp. 660-667, 2013.
- [20] 中馬一郎, 高田明和, *新生理科学大系 第15巻 血液の生理学*, 東京: 医学書院, 1990, pp. 1-88.
- [21] 正宅修司, *よくわかる血液ガス*, 東京: 中外医学社, 2007, pp. 22-23.
- [22] 諏訪邦夫, *血液ガスの臨床*, 東京: 中外医学社, 2006, pp. 4-106.
- [23] 諏訪邦夫, *パルスオキシメータ*, 東京: 中外医学社, 1989.
- [24] J. W. Severinghaus, “Blood gas calculator,” *J. Appl. Physio.*, vol. 21, pp. 1108-1116, 1966.
- [25] P. V. A. Pamidi, M. DeAbreu, D. Kim, and S. Mansouri, “Hydroxocobalamin and cyanocobalamin interference on co-oximetry based hemoglobin measurements,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 401, pp. 63-67, 2009.

図表

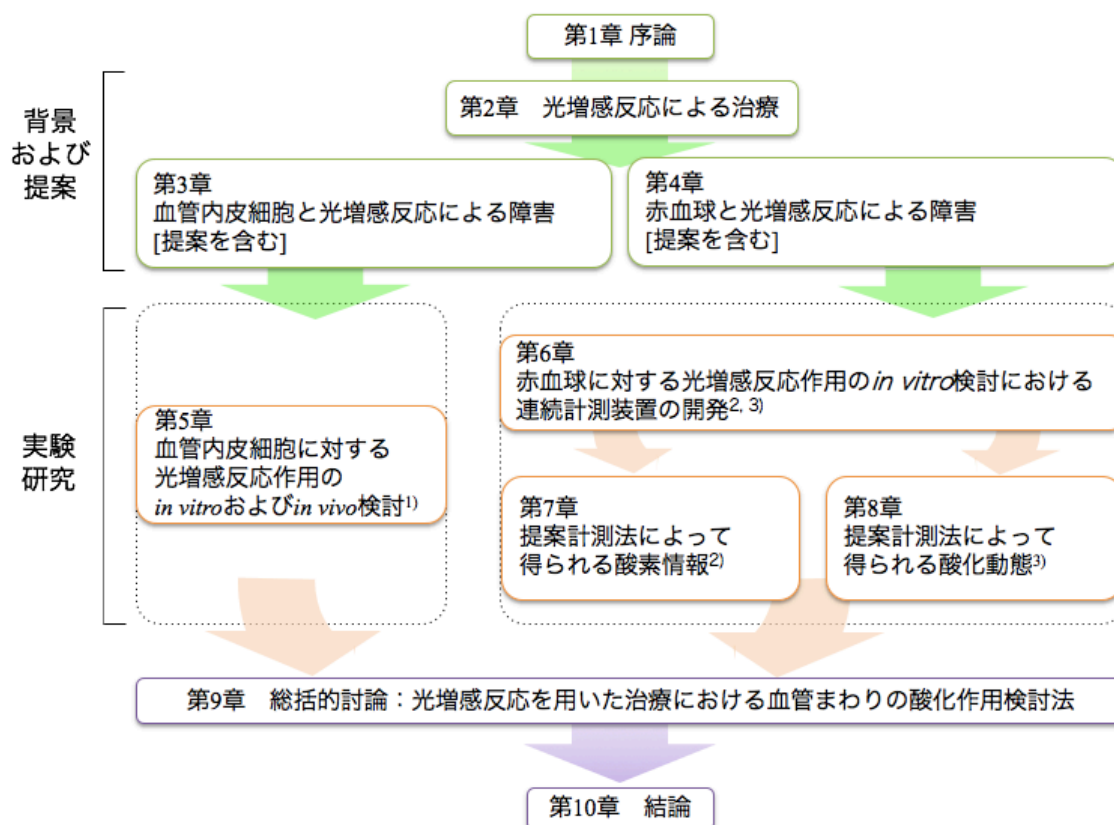


図 1-1 本論文の構成

第2章 光増感反応による治療

2.1 緒言

光増感反応とは、光励起された光感受性薬剤が周囲に存在する酸素にエネルギーを移乗し、酸化力の強い一重項酸素を産生する光化学反応のことである。光増感反応の生体組織への酸化作用は、細胞に対する光感受性薬剤の分布場所によって異なる殺細胞機構をもつ。第2章では光増感反応の原理を説明するとともに、光感受性薬剤の細胞内外の分布における殺細胞機構とその違いを活かした種々の疾患に対する光線力学的治療に関して述べる。

2.2 光増感反応

2.2.1 反応機構

光増感反応とは、光・酸素・光感受性薬剤 (Photosensitizer, PS と略す) の三要素により一重項酸素を産生する光化学反応のことである。光増感反応のエネルギーダイアグラムを図2-1に示す。基底状態にある光感受性薬剤 PS (S_0) は一重項状態への遷移に必要な波長の光を吸収すると励起一重項状態 PS (S_1) に遷移する。この励起一重項状態 PS (S_1) は、一部は蛍光を発して基底状態 PS (S_0) に戻るが、大部分はスピン反転を伴う項間交差によりエネルギーの低い励起三重項状態 PS (T_1) に非放射的に移行する [1]。PS (S_1) の溶液中における寿命は 1-10 ns であるのに対し、励起三重項状態 PS (T_1) の寿命は 1-10 μ s と長いため周囲の分子との反応が起こりやすい [2, 3]。励起三重項状態の寿命が長い理由は、励起三重項状態から基底状態への遷移に必要なスピン反転が低確率でしか起こらないためである。この励起三重項状態から基底状態へのエネルギー経路には、Type I 反応、Type II 反応、そして低い確率だが燐光を発して遷移するという3種類がある。Type I 反応では、励起三重項状態の光感受性薬剤が直接周囲の生体分子や酸素との間で一電子酸化還元反応を起こす反応のことである [4]。この反応により生成されたフリーラジカルの中間生成物は組織溶存酸素と反応してフリーラジカル連鎖反応を起こす。これにより、例えば水が対象となった場合はヒドロキシラジカルや超酸化物イオンなど、種々の活性酸素が産生されることにより組織が酸化障害を受ける。一方で Type II 反応は、励起三重項状態の光感受性薬剤が基底状態に遷移する際に組織内の溶存三重項酸素 3O_2 にエネルギーが移乗し、一重項酸素 1O_2 が発生する反応のことである。活性酸素の一種である一重項酸素は強い酸化作用をもつため、蛋白質、核酸、および脂質などの生体分子と反応して細胞の変性や壊死といった酸化障害を起こす [5, 6]。生体内における一重項酸素の半減期は 10-320 ns と短く、これは細胞内において一重項酸素の効果が及ぶ領域が半径 10-55 nm ということを示す。このことより、一重項酸素の産生場所すなわち光感受性薬剤の分布場所近傍にある細胞や生体組織のみが直接的に光増感反応による酸化障害を受けると考えられる [1, 7]。光毒性と殺細胞効果が及ぶ範囲は、放

照射量、放射照度、酸素環境、光感受性薬剤の種類、薬剤投与から光照射までの時間、細胞内における分布場所、総投与量、など種々の要因に影響を受ける。Type I 反応と Type II 反応は同時に起こるが、両者の発生割合は、光感受性薬剤の種類や濃度、蛋白質との結合親和性および酸素環境に影響を受ける [1]。Type I 反応は Type II 反応に比べ障害過程が複雑であることより、多くの光感受性薬剤はより単純な過程である Type II 反応による一重項酸素発生およびその酸化作用による組織障害が支配的であると考えられる [4, 8, 9]。また、酸素に依らず光感受性薬剤が直接的に対象を障害する経路 (Type III 反応) が生じる可能性も示唆されている。しかしこの Type III 反応は DNA が対象としてになってしまう可能性があり、光増感反応を用いた治療の化学療法に対する最大の特長である発がん性物質の危険性が低い特性が失われるという大きな欠点がある [4]。

2.2.2 光感受性薬剤

光増感反応を用いた生体組織傷害を目的とした治療における光感受性薬剤は、治療効果および安全性の観点から特に以下の特徴が求められる [10]。

- (i) 光照射を行わない場合に生体に対する毒性がなく化学的に安定な構造をもつ
- (ii) 一重項酸素生成量子収率 Φ_{Δ} が大きい
- (iii) 生体に対する光侵達長が長い近赤外波長 (600~800 nm) に吸収帯を有する
- (iv) 治療後に正常組織から速やかに排泄される

(iii) において、生体内の主な吸収体である、水、メラニンおよびヘモグロビンの吸収が小さい波長領域 650-850 nm は生体の分光学的窓と呼ばれる[11]。一重項酸素のエネルギー準位は波長 1.27 μm 相当なので、一重項酸素の生成には吸収端がこの波長よりも短波長側にある必要があり、生体の分光学的窓の波長域はこの条件を満たす。以上より、より深部への治療を可能にするためにはこの分光学的窓における励起波長が望ましい。[12, 13]。(iv) において、治療後も皮膚に残留する薬剤に適切な波長の光が当たると光線過敏症を起こすことが、光増感反応を用いた治療における最大の副作用である。このため、術後の遮光期間が定められているが、患者の QOL 向上には光感受性薬剤の早い排泄性が求められる。種々の光感受性薬剤をそれぞれ表 2-1 に示す。大半の光感受性薬剤は、葉緑体やヘモグロビンのヘムなどの構造と似た複素環構造をもつ [11]。本節では我が国で臨床適用されている代表的な光感受性薬剤に関して述べる。

第一世代光感受性薬剤であるポルフィマーナトリウムは、早期肺癌治療薬として 1994 年に我が国で最初に認可を受けた [14, 15]。ポルフィマーナトリウムの化学構造式を図 2-2 に示す。ポルフィマーナトリウムに代表されるポルフィリン系化合物は 4 つのピロールがメチン基で結合した環状化合物で、ヘモグロビンの基本骨格となる構造体である。ポルフィマーナトリウムは我が国において、早期肺癌 (病期 0 期または病期 I 期肺癌)、表在型食道癌、表在型早期胃癌、子宮頸部初期癌および異型性の治療において薬事承認を得ている [14]。

しかし課題として、重合数 60 以上の化学物であるため化学的に不安定 [4]、吸収帯が 500-630 nm であるため深部の治療が難しく、さらにモル吸収係数が低い [16-18]、排泄速度が遅いため治療後の光線過敏症の発症リスク期間が 4-6 週間と長期 [18]、などがある。そこで第二世代光感受性薬剤が開発された [10, 19]。

第二世代光感受性薬剤は第一世代光感受性薬剤よりも吸収帯のピーク波長が長波長側にあり、さらにモル吸収係数が向上したことにより、深部への高反応効率の治療が可能になった。さらに生体における排泄速度も向上している [1, 10, 18]。日本で臨床適用されている第二世代光感受性薬剤はタラポルフィンナトリウムとベルテポルフィンである。それぞれの化学構造を図 2-3、図 2-4 に示す。タラポルフィンナトリウムは、我が国において 2003 年に早期肺癌治療、2013 年に原発性悪性脳腫瘍治療、2015 年に化学放射線療法又は放射線療法後の局所遺残再発食道癌に対する治療法における治療剤として承認を取得した。タラポルフィンナトリウムは植物の葉緑素由来の単一物質であり、クローリン骨格にアスパラギン酸をアミド結合させたクローリン系光感受性薬剤である。タラポルフィンナトリウムは水溶性の光感受性剤であるため排泄速度が速く、親水性および親油性の塩基を有するため細胞膜への受動輸送が行われやすいという特長を持つ。薬剤投与 2 週間後には皮膚の光線過敏反応が消失していることが報告されている [10]。Q 帯吸収ピーク波長はポルフィマーナトリウムよりも長波長の 664 nm をもつ。この波長におけるモル吸収係数は $4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であり、これはポルフィマーナトリウムの吸収係数より 10 倍以上高い [18, 20, 21]。ベルテポルフィンは、我が国において 2003 年に中心窩下の脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性症の治療剤として承認を取得した。ベルテポルフィンはポルフィリン系光感受性薬剤であり、親油性を示す。BPD-MA (benzoporphyrin derivative monoacid) の 2 つの異性体である BPD-MA_C と BPD-MA_D が 1:1 で存在している [23]。また、薬剤が血管内に留るためために大きな薬剤形態をとるリポゾーム製剤である。水溶液における Q 帯吸収ピーク波長はポルフィマーナトリウムよりも長波長の 690 nm をもち、この波長におけるモル吸収係数は $1.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である [18]。ベルテポルフィンは集積および排泄速度が早いため、薬剤投与後数時間で皮膚の光線過敏症が消失することが知られており、これは他の薬剤に比べて著しく短い。

2.2.3 細胞内外に対する光増感反応の作用

一重項酸素の寿命は、水中で 4 μs 、細胞内で 0.6 μs と非常に短く拡散距離が限られているため、一重項酸素による酸化障害影響領域は光感受性薬剤近傍に限定される [1, 7, 19]。光増感反応による殺細胞機序は、細胞に対する一重項酸素の産生場所によって異なる。すなわち細胞に対する光感受性薬剤の分布によって殺細胞機序が異なることから、光増感反応による作用は細胞内光増感反応と細胞外光増感反応に大別される。光感受性薬剤の分布は、薬剤の構造や電荷、親水性/親油性に影響を受ける [1, 24]。光感受性薬剤の細胞への取り込み動態は、細胞と薬剤の種類、薬剤投与から光照射までの時間、投与薬剤量、温度、pH、など

種々の要素に影響をうける [25-27]。

細胞内光増感反応により細胞小器官が障害を受けた時の一般的な細胞死経路は、増殖制御機構でプログラミングされた能動的細胞死であるアポトーシスであることが知られている。光感受性薬剤の種類によって、細胞内のどこに薬剤が取り込まれるかが異なる。親油性薬剤では、血漿、ミトコンドリア、リソソーム、エンドソーム、網膜および角膜を含む膜にある程度優先的に分布し、膜透過性の変化、流動性の損失、アミノ脂質とポリペプチドの架橋、膜結合酵素システムと受容体の不活性化をもたらす。なかでもミトコンドリアに対する光増感反応の殺細胞効果が、主要なメカニズムとされている [8, 19]。一方、親水性薬剤では、リソソームにある程度優先的に分布し、これらの構造破壊および加水分解酵素の細胞質への放出を起こす。タラポルフィンナトリウムの殺細胞効果はこのリソソームでの傷害が主体であると考えられている [19]。ヘマトポルフィリン誘導体は、単量体、二量体および重合体で構成されているが、比較的構造の小さい単量体および二量体はミトコンドリアに、比較的構造の大きな重合体は細胞膜に取り込まれる [29]。タラポルフィンナトリウムはエンドサイトーシスによりリソソームに、ベルテポルフィンがゴルジ体へ集積することが報告されている [30-32]。細胞内の障害部位によってアポトーシスに至る経緯は異なるが、いずれも細胞死が起こるまで数時間から数日を要する [4, 33, 34]。腫瘍組織に対する治療では、光感受性薬剤の腫瘍組織や腫瘍血管内皮に対する集積性を利用し、上記の分類では細胞内光増感反応を利用する治療と言える。これらの組織において光感受性薬剤の集積性が高い理由は、光感受性薬剤の分子化学的な親和性と健常組織に対する腫瘍組織の排泄性の違いにより説明できる。疎水性の光感受性薬剤は主に低比重リポ蛋白、親油性の光感受性薬剤は主にアルブミンや高比重リポ蛋白との親和性が高い。さらに、水分が多い環境では親水基の側鎖基を外側に出し、疎水性の環境下では疎水基を外側に出すという特異な両媒性を持つ。この性質をスタッキング現象と呼ぶ [14]。スタッキング現象によって、光感受性薬剤は親水性により血流を介して輸送され、親油性により蛋白と強い親和性を持つことで腫瘍細胞や新生血管へ集積する。血流を介することで、薬剤の損傷や重合および分解などを起こさずに対象組織まで薬剤を輸送することができる [4]。腫瘍組織や新生血管内皮など活発な増殖が行われる組織では低比重リポ蛋白の取り込みおよび細胞膜表面における低比重リポ蛋白レセプターの活性が健常組織に比べて高いため、光感受性薬剤と結合した低比重リポ蛋白を能動的に取り込み、細胞内光感受性濃度が増加する。また高比重リポ蛋白に結合した光感受性薬剤は腫瘍内に浸潤した腫瘍関連のマクロファージによる貪食作用によって取り込まれる。一方で、腫瘍組織や新生血管はリンパ系が未発達であるために光感受性薬剤が滞留しやすい排泄特性を持つ [29, 35]。このため、腫瘍組織は健常組織に比べて相対的に高い薬剤濃度を得られることを利用して、細胞内光増感反応を用いた悪性腫瘍や腫瘍血管内皮に対する治療では選択的な治療を実現する。

一方、細胞外光増感反応により細胞膜が障害を受けた時の一般的な細胞死経路は、外的環

境要因による受動的細胞死のネクローシスである。親油性の高い光感受性薬剤は細胞膜に集積することが報告されている [36]。タラポルフィンナトリウムなどはエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる。細胞膜周囲や細胞膜内にある光感受性薬剤による光増感反応により細胞膜の過酸化やイオンチャネルの障害が即時的に起こることで、細胞内に Ca^{2+} が流入し、細胞が膨張することでネクローシスに至る [37]。

2.3 光増感反応を用いた治療

2.3.1 腫瘍組織に対する細胞内光増感反応

2.2.3 節で述べたとおり、細胞内光増感反応を利用する腫瘍組織に対する光線力学的治療では、光感受性薬剤の腫瘍組織に対する集積性を利用し光増感反応により産生される一重項酸素の殺細胞効果を用いて選択的な治療を行う。腫瘍組織に対する光増感反応を用いた治療は、2.2.2 節で述べたとおり我が国で承認を得ており、臨床応用されている。細胞内光増感反応による腫瘍組織の崩壊は、

- (i) 一重項酸素の酸化力による直接的な腫瘍殺細胞作用
- (ii) 腫瘍血管系が障害されることによる間接的な腫瘍壊死
- (iii) 光増感反応による腫瘍細胞に対する免疫反応の発症

の3つの機序が関係する。これらの機序は相互にも影響を及ぼし合い、長期的な観点から考えるとこれら全ての機序が必要である [1]。

(i) 光増感反応による直接的な殺細胞効果によりクローン形成腫瘍の細胞数が減少することが *in vivo* 実験で報告されている [38]。しかし、光感受性薬剤の不均一分布と低酸素環境の観点から、直接的な殺細胞効果のみによる腫瘍の根治効果は不確実である。供給血管からの距離に応じて光感受性薬剤の集積量と腫瘍細胞の死細胞率は共に低下すると報告されている。また、励起レーザ光照射中の組織内酸素分圧が急速に減少するとの報告がある [39]。励起光照射中に反応進行による酸素消費および組織内毛細血管の即時的な障害による血管閉塞が生じると酸素不足になる可能性があり、光増感反応による腫瘍組織への治療効果の低下につながる [40-42]。

(ii) 腫瘍血管の閉塞は、腫瘍細胞が生存するための要因の一つである血管からの酸素や養分の供給を遮断するため、間接的に腫瘍組織に障害を与える有効な手法と考えられる [1]。光感受性薬剤は腫瘍組織のみならず新生血管の内皮細胞にも高濃度で分布するため、光照射により新生血管内皮細胞が損傷を受け、血小板の付着、凝集などによる血栓形成が生じ血管閉塞が誘導される。実際、腫瘍組織に対する光増感反応によって毛細血管が閉塞し組織の低酸素状態によって組織壊死が導かれることが多数報告されている [42-46]。腫瘍組織に対する光増感反応を用いた治療において急性期に確認される組織壊死は、この血管閉塞による影響が支配的であると考えられている [19]。

(iii) 1980年代から1990年代初期に、免疫応答の活性化を示唆するリンパ球、白血球、およ

びマクロファージが光線力学的治療施行組織への浸潤することが報告された [19,47]。健康組織と腫瘍組織の炎症反応は性質や度合いが異なり、これは光増感反応を用いた治療における腫瘍組織に対する組織壊死の選択性向上に貢献する [1]。実際に光増感反応により好中球が蓄積し、腫瘍の増殖が抑えられたとの報告がある [48]。また、直接的な殺細胞効果により大部分の腫瘍を障害することは可能だが、完全に腫瘍細胞を壊死させるためには免疫反応が必要と考えられている [49]。

細胞内光増感反応による治療は、選択的に腫瘍組織に傷害を及ぼすことができるため従来の切除術に比べて侵襲性が低く、患者の Quality of life を改善できると考えられている。しかし、広く普及するに至っていない理由として、治療の不均一性、光線過敏症防止のため遮光入院が必要、治療効果判断が即時的にできない、などがある。この中でも光線過敏症が最も懸念されている。光線過敏症とは術後も皮膚に光感受性薬剤が残留している状態で直射日光や集中光を浴びると起こる皮膚炎であり、この副作用抑制の対策として術後に遮光期間が設けられている [50]。細胞内光増感反応を用いた腫瘍組織に対する治療は選択的で侵襲性が低いため、これまでに皮膚、脳、耳鼻咽喉部、呼吸器、消化器、泌尿生殖器など幅広い臨床科で臨床報告されている。しかし、現状では上記のような課題がいくつか残っている [19]。

2.3.2 新生血管内皮に対する光増感反応

中心窩下の脈絡膜新生血管を伴う加齢黄斑変性症に対する治療法として、リポゾーム製剤である光感受性薬剤ベルテポルフィン（販売名：ビスダイン）を用いた光線力学的治療がある。この治療は、脈絡膜新生血管を選択的に閉塞および退縮することを目的としている。正常網膜への損傷を抑えながらその治療効果を得られる治療法として、その有用性が大きく期待され、2013年2月時点で世界72カ国において承認されている。2.2.2節で述べたとおり、我が国においては2003年10月に承認された。治療手順は、ビスダイン 6 mg/m^2 （体表面積）を10 min かけて静脈内投与し、投与15 min 後に波長 $689\pm 3\text{ nm}$ 、 600 mW/cm^2 で 50 J/cm^2 のレーザ光照射を行う。術後は3ヵ月毎に蛍光眼底造影の検査を行う。この検査で脈絡膜新生血管からのフルオレセインの漏出が認められた場合は、再治療を実施する [23]。

ビスダインは主に低比重リポ蛋白によって輸送される [51,52]。新生血管のような増殖性細胞の内皮細胞組織では、低比重リポ蛋白の取込みおよび細胞膜表面におけるこのレセプターの発現が増加していると考えられる [23]。このことより、治療対象である脈絡膜新生血管にベルテポルフィンが集積するため選択的治療を可能にする。

2.3.3 菌類に対する細胞外光増感反応

感染症の主な治療法である抗生物質等では薬剤耐性を持つ病原菌が出現することがある [53-55]。種々の抗生物質に対する薬剤耐性病原菌出現により、光増感反応による一重項酸素

の酸化作用を用いた抗生剤とは異なる殺菌機序が注目を集めた [53]。感染症に対する光線力学的治療は Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) あるいは antimicrobial-PDT (a-PDT) と呼ばれる。この治療では、局在する細菌や真菌、ウィルス、寄生虫などの幅広い病原体に対して効果を示すと期待されている [56-58]。局所的に光感受性薬剤を投与し、光感受性薬剤が細胞膜や外膜に分布した状態で光照射を行うことで菌類の不活性化および壊死を起こし感染症を治療する。細胞膜のコレステロールや脂質が傷害され、細胞内基質の漏出や膜輸送システム酵素の不活性化および RNA や DNA の損傷を引き起こすというのが主な障害機序である [5, 53]。PACT に用いられる代表的な光感受性薬剤は、フェノチアジン系のメチレンブルーやトルイジンブルーO である [59]。その他にもポルフィリン系、キサンテン誘導体、クローリン系、フタロシアニン系の光感受性薬剤が用いられており、近年では広範囲の細菌ウィルスへの効果を示す薬剤としてアミノレブリン酸を用いた治療が注目されている [53, 59]。抗菌効果は、グラム陽性/陰性菌の光不活性化が重要な因子である。この光不活性化は、菌膜と光感受性薬剤の構造が関係している [59]。カチオンおよびアニオン性の光感受性薬剤分子は効率的にグラム陽性菌と結合し光増感反応により不活性化する。一方、これらの光感受性薬剤はグラム陰性菌の外膜に多少なりとも結合する性質はあるが、励起光照射をしてもグラム陰性菌は不活性化されない [5, 60]。グラム陽性菌の膜は比較的多孔性のペプチドグリカンおよびリポティコ酸の層によって取り囲まれており、これにより光感受性薬剤の膜透過を可能にしている [59, 60]。一方、グラム陰性菌の膜はより複雑な構造をもつ。グラム陰性菌の細胞外皮は、細胞内膜と外膜から成り、これらはペプリドグリカン層により隔てられている [5]。外膜はリポ多糖体や種々の蛋白質を含むリン脂質二重膜から成り、外界に対する物理的かつ機能的なバリアを形成している [5, 59]。アニオン構造をもつ光感受性薬剤はリポ多糖体を通過できないため、一重項酸素が細菌性細胞の近傍に発生したときにのみ光増感反応による抗菌効果を示す。一方、ポリカチオン性の分子構造をもつ光感受性薬剤はグラム陰性菌の光不活性を示す。このことより、カチオン構造の光感受性薬剤は、アニオンやニュートラル構造の光感受性薬剤に比べ広範囲の細菌類を不活性化することができる [59]。メチレンブルーを始め、PACT に用いられる多くの光感受性薬剤はカチオン構造をもっている。カチオン構造の光感受性薬剤は、両性イオンである健常細胞膜よりもカチオン構造をもつ細菌と即座に結合することができることから、健常細胞膜に対する細菌への選択的な治療が可能となる [53, 61]。メチレンブルーを用いた光増感反応による抗菌作用が、カンジダやアルピカンスによる歯周病や輸血血液、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌、バンコマイシン耐性腸球菌などに及ぼす効果に関して現在臨床試験が進められている。特に歯周病に対する光増感反応による治療は “Periowave™” と名付けられており、歯周病に対する主要な治療法となりつつある [53]。

2.3.4 健常心筋組織に対する細胞外光増感反応

著者らは、光増感反応を用いた頻脈性不整脈治療 PD ABLATION[®]を提案している。この治療では、異常電気伝導路上の健常心筋組織に対して光増感反応による酸化作用を及ぼすことで組織壊死を起こし、電気伝導遮断線の作成を行う。PD ABLATION[®]による異常電気伝導遮断効果や副作用に関する検討は、現在までに150例以上の大型動物を用いた *in vivo* 実験により行われてきた [62-64]。光感受性薬剤タラポルフィンナトリウムを投与し15-60 minに、経カテーテル的に治療部位へ配置したプローブを介して励起レーザ光照射を行う治療手順を構想している。PD ABLATION[®]では対象が健常な心筋組織であることより、光感受性薬剤の集積性を利用せず、薬剤が心筋細胞周囲に均一かつ高濃度で分布する光感受性薬剤投与後早期 (15-60 min) に光照射を行う。これにより、心筋細胞のイオンチャネル障害や細胞膜障害を起こし、即時的な細胞死であるネクロシスを効率的に狙う。現行の心房細動に対する根治治療では、異常電気伝導路上の心筋組織に対して熱的作用により熱凝固壊死を起こすため、周囲組織への熱的副作用が問題となっている [65]。一方、PD ABLATION[®]では光増感反応による酸化作用を利用するため、熱発生を抑えることができる。また、励起レーザ光の照射条件を調整することで作用深度を制御できるため、優れた治療領域選択性を実現できる。以上より、現行の心房細動治療法に比べ、より低侵襲な治療が実現可能であると期待する。

2.4 結言

本章では、光増感反応原理を踏まえて光感受性薬剤の分布場所に応じた殺細胞機序の違いおよび光増感反応を用いた種々の疾患に対する治療に関して解説した。

参考文献

- [1]□ D. E. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, “Photodynamic therapy for cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 3, pp. 380-387, 2003.
- [2]□ T. Takemura, S. Nakajima, and I. Sakata, “Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 50, pp. 339-344, 1989.
- [3]□ M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, “Photosensitized singlet oxygen and its applications,” *Coord. Chem. Rev.*, vol. 233, pp. 351-371, 2002.
- [4]□ R. Allison and C. H. Sibata, “Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review,” *Photodiagn. Photodyn.*, vol. 7, pp. 61-75, 2010.
- [5]□ M. R. Hamblin and T. Hasan, “Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 3, pp. 436-450, 2004.
- [6]□ R. W. Redmond and J. N. Gamlin, “A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 70, pp. 391-475, 1999.
- [7]□ J. Moan and K. Berg, “The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 53, pp. 549-553, 1991.
- [8]□ T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korblik, J. Moan, and Q. Peng, “Photodynamic Therapy: Review,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 90, pp. 889-902, 1998.
- [9]□ K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, and T. J. Dougherty, “Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor,” *Cancer Res.*, vol. 36, pp. 2326-2329, 1976.
- [10]□ R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X. H. Hu, C. J. Childs, and C. H. Sibata, “Photosensitizers in clinical PDT,” *Photodiagn. Photodyn.*, vol. 1, pp. 27-42, 2004.
- [11]□ Z. Huang, “A review of progress in clinical photodynamic therapy,” *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 4, pp. 283-293, 2005.
- [12]□ 小原實, 荒井恒憲, 緑川克実, レーザ応用工学, 東京: コロナ社, 1993, pp. 189-192, 1993.
- [13]□ 電気学会次世代バイオメディカル・レーザ応用技術調査専用委員会編, バイオメディカルフォトリクス: 生体医用工学の基礎と応用, 東京: 電気学会: オーム社, 2009, pp. 12-21.
- [14]□ 加藤治文, PDT ハンドブック, 東京: 医学書院, 2002, pp. 1-10, 2002.
- [15]□ ファイザー株式会社, フォトフリン[®] 静注用 75 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2015 年 11 月改訂 (第 10 版).
- [16]□ R. Bonnett, “Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic

- therapy,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 24, pp. 19-33, 1995.
- [17]□K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, and T. Kiesslich, “Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects,” *Lasers Med. Sci.*, vol. 24, pp. 259-268, 2002.
- [18]□P. G. Valzavara-Pinton, M. Venturini, and R. Sala, “Photodynamic therapy: Update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology,” *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, vol. 21, pp. 293-302, 2007.
- [19]□B. W. Henderson and T. J. Dougherty, “How does photodynamic therapy work?,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 55, pp. 145-157, 1992.
- [20]□Meiji Seika ファルマ株式会社, 注射用レザフィリン□ 100 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2016 年 6 月改訂 (第 10 版).
- [21]□A. E. O’Connor, W. M. Gallagher, and A. T. Byrne, “Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 85, pp. 1053–1074, 2009.
- [22]□P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, and J. Golab, “Photodynamic therapy of cancer: an update,” *CA Cancer J. Clin.*, vol. 61, pp. 250-281, 2011.
- [23]□ノバルティスファーマ株式会社, ビスダイン□ 静注用 15 mg, 医薬品インタビューフォーム, 2016 年 6 月改訂 (第 8 版).
- [24]□R. K. Jain, “Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 46, pp. 149-168, 2001.
- [25]□G. Oenbrink, J. Petra, and D. Gabel, “Accumulation of porphyrins in cells: influence of hydrophobicity aggregation and protein binding,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 48, pp. 451-456, 1988.
- [26]□L. Cincotta, J. W. Foley, and A. H. Cincotta, “Phototoxicity, redox behavior, and pharmacokinetics of benzophenoxazine analogues in EMT-6 murine sarcoma cells,” *Cancer Res.*, vol. 53, pp. 2571-2580, 1993.
- [27]□J. Hanania and Z. Malik, “The effect of EDTA and serum on endogenous porphyrin accumulation and photodynamic sensitization of human K562 leukemic cells,” *Cancer Lett.*, vol. 65, pp. 127-131, 1992.
- [28]□G. McBride, “Studies expand potential uses of photodynamic therapy,” *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 94, pp. 1740-1742, 2002.
- [29]□J. Osterloh and M. G. H. Vicente, “Mechanisms of porphyrinoid localization in tumors,” *J. Porphyr. Phthalocyanines*, vol. 6, pp. 305-324, 2002.

- [30] N. L. Olenick, R. L. Morris, and I. Belichenko, "The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how," *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 1, pp. 1-21, 2002.
- [31] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal, and M. R. Hamblin, "Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer," *Cancers*, vol. 3, pp. 2516-2539, 2011.
- [32] P. A. Scourides, R. M. Böhmer, A. H. Kaye, and G. Morstyn "Nature of the tumor-localizing components of hematoporphyrin derivative," *Cancer Res.*, vol. 47, pp. 3439-3445, 1987.
- [33] K. Berg and J. Moan, "Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer," *Photochem. Photobiol.*, vol. 65, pp. 403-409, 1997.
- [34] A. M. Richter, S. Yip, H. Meadows, A. K. Jain, H. Neyndorff, G. Moreno, C. Salet, and J. G. Levy, "Photosensitizing potencies of the structural analogues of benzoporphyrin derivative in different biological test systems," *J. Clin. Laser Med. Surg.*, vol. 14, pp. 335-341, 1996.
- [35] K. Aizawa, T. Okunaka, T. Ohtani, and I. Kawabe, "Localisation of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissues," *Photochem. Photobiol.*, vol. 46, pp. 789-93, 1987.
- [36] D. Kessel, M. Castelli, and J. Reiners Jr., "What are the targets of photodynamic therapy?," *Proc. SPIE*, vol. 4612, pp. 122-127, 2002.
- [37] A. Ito, T. Kimura, S. Miyoshi, S. Ogawa, and T. Arai, "Photosensitization reaction-induced acute electrophysiological cell response of rat myocardial cells in short loading periods of talaporfin sodium or porfimer sodium," *Photochem. Photobiol.*, vol. 87, pp. 199-207, 2011.
- [38] B. W. Henderson, S. M. Waldow, T. S. Mang, W. R. Potter, P. B. Malone, and T. J. Dougherty, "Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy," *Cancer Res.*, vol. 45, pp. 572-576, 1985.
- [39] B. J. Tromberg, A. Orenstein, S. Kimel, S. J. Barker, J. Hyatt, J. S. Nelson, and M. W. Berns, "In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 52, pp. 375-385, 1990.
- [40] B. W. Pogue, A. Orenstein, S. Kimel, S. J. Barker, J. Hyatt, J. S. Nelson, and M. W. Berns, "Analysis of the heterogeneity of pO₂ dynamics during photodynamic therapy with verteporfin," *Photochem. Photobiol.*, vol. 74, pp. 700-706, 2001.
- [41] W. M. Star, H. P. Marijnissen, A. E. van den Berg-Blok, J. A. Versteeg, K. A. Franken, and H. S. Reinhold, "Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers," *Cancer Res.*, vol. 46, pp. 2532-2540, 1986.
- [42] M. W. Reed, F. N. Miller, T. J. Wieman, M. T. Tseng, and C. G. Pietsch, "The effect of photodynamic therapy on the microcirculation," *J. Surg. Res.*, vol. 45, pp. 452-459, 1988.

- [43]□V. H. Fingar, T. J. Wieman, and P. S. Haydon, “The effects of thrombocytopenia on vessel stasis and macromolecular leakage after photodynamic therapy using photofrin.” *Photochem. Photobiol.*, vol. 66, pp. 513-517, 1997.
- [44]□B. W. Henderson and V. H. Fingar, “Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor,” *Cancer Res.*, vol. 47, pp. 3110-3114, 1987.
- [45]□T. M. Busch, E. P. Wileyto, M. J. Emanuele, F. Del Piero, L. Marconato, E. Glatstein, and C. J. Koch, “Photodynamic therapy creates fluence rate-dependent gradients in the intratumoral spatial distribution of oxygen,” *Cancer Res.*, vol. 62, pp. 7273-7279, 2002.
- [46]□K. S. McMahon, T. J. Wieman, P. H. Moore, and V. H. Fingar, “Effects of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 on vessel constriction, vessel leakage, and tumor response,” *Cancer Res.*, vol. 54, pp. 5374-5379, 1994
- [47]□B. P. Shumaker and F. W. Hetzel, “Clinical laser photodynamic therapy in the treatment of bladder carcinoma,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 46, pp. 899-901, 1987.
- [48]□W. J. A. de Vree, M. C. Essers, H. S. de Bruijn, Star, W. M., J. F. Koster, and W. Sluiter, “Evidence for an important role of neutrophils in the efficacy of photodynamic therapy in vivo,” *Cancer Res.*, vol. 56, pp. 2908-2911, 1996.
- [49]□M. Korbelik, G. Kros, J. Kros, and G. J. Dougherty, “The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy” *CancerRes.*, vol. 56, pp. 5647-5652, 1996.
- [50]□E. Bromley, B. Briggs, L. Keltner, and S. S. Wang, “Characterization of cutaneous photosensitivity in healthy volunteers receiving talaporfin sodium,” *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, vol. 27, pp. 85-89, 2011.
- [51]□R. W. Redmond and I. E. Kochevar, “Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 82, pp. 1178-1186, 2006.
- [52]□J. S. Dysart and M. S. Patterson, “Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 50, p. 2597, 2005.
- [53]□D. A. Phoenix, F. Harris, and S. Dennison, “Novel antimicrobial agents and strategies,” *John Wiley Sons*, vol. 10, pp. 295-330, 2014.
- [54]□A. R. White, M. Blaser, O. Carrs, G. Cassell, N. Fishman, R. Guidos, and R. Davies, “Effective antibacterials: at what cost? The economics of antibacterial resistance and its control,” *J. Antimicrob. Chemoth.*, vol. 66, pp. 1948-1953, 2011.

- [55] □D. M. Livermore, M. Blaser, O. Carrs, G. Cassell, N. Fishman, R. Guidos, and Davies, R, “Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics,” *J. Antimicrob. Chemoth.*, vol. 66, pp. 1941-1944, 2011.
- [56] □M. S. Baptista and M. Wainwright. “Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis,” *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 44, pp. 1-10, 2011.
- [57] □K. Krafts, E. Hempelmann, and Agnieszka Skórska-Stania, “From methylene blue to chloroquine: a brief review of the development of an antimalarial therapy,” *Parasitol. Res.*, vol. 111, pp. 1-6, 2012.
- [58] □M. Wainwright and A. Leonard, “Review: The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs,” *Trop. Med. Int. Health*, vol. 10, pp. 501-511, 2005.
- [59] □L. Ryskova, V. Buchta, and R. Slezak, “Photodynamic antimicrobial therapy,” *Open Life Sci.*, vol. 5, pp. 400-406, 2010.
- [60] □Z. Malik, H. Ladan, and Y. Nitzan, “Photodynamic inactivation of Gram-negative bacteria: problems and possible solutions,” *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.*, vol. 14, pp. 262-266, 1992.
- [61] □T. Dai, Y. Huang, and M. R. Hamblin, “Photodynamic therapy for localized infections—state of the art,” *Photodiagn. Photodyn.*, vol. 6, pp. 170-188, 2009.
- [62] □T. Kimura, S. Takatsuki, S. Miyoshi, K. Fukumoto, M. Takahashi, E. Ogawa, A. Ito, T. Arai, S. Ogawa, and K. Fukuda, “Nonthermal cardiac catheter ablation using photodynamic therapy,” *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.*, vol. 6, pp. 1025-1031, 2013.
- [63] □A. Ito, S. Miyoshi, T. Kimura, S. Takatsuki, K. Fukumoto, K. Fukuda, and T. Arai, “Myocardial electrical conduction block induced by photosensitization reaction in exposed porcine hearts in vivo,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 43, pp. 984-990, 2011.
- [64] □A. Ito, T. Kajihara, M. Takahashi, T. Kimura, K. Fukumoto, S. Takatsuki, S. Miyoshi, and T. Arai, “Non-thermal myocardial electrical conduction block by photosensitization reaction with catheterization in right atrium isthmus of porcine heart *in vivo*,” *Proc. SPIE*, vol. 7883, pp. 78833K-1-6, 2010.
- [65] □K. Matsudaira, H. Nakagawa, F. H. Wittkamp, W. S. Yamanashi, S. Imai, J. V. Pitha, R. Lazzara, and W. M. Jackman, “High incidence of thrombus formation without impedance rise during radiofrequency ablation using electrode temperature control,” *Pacing Clin. Electrophysiol.*, vol. 26, pp. 1227-1237, 2003.

図表

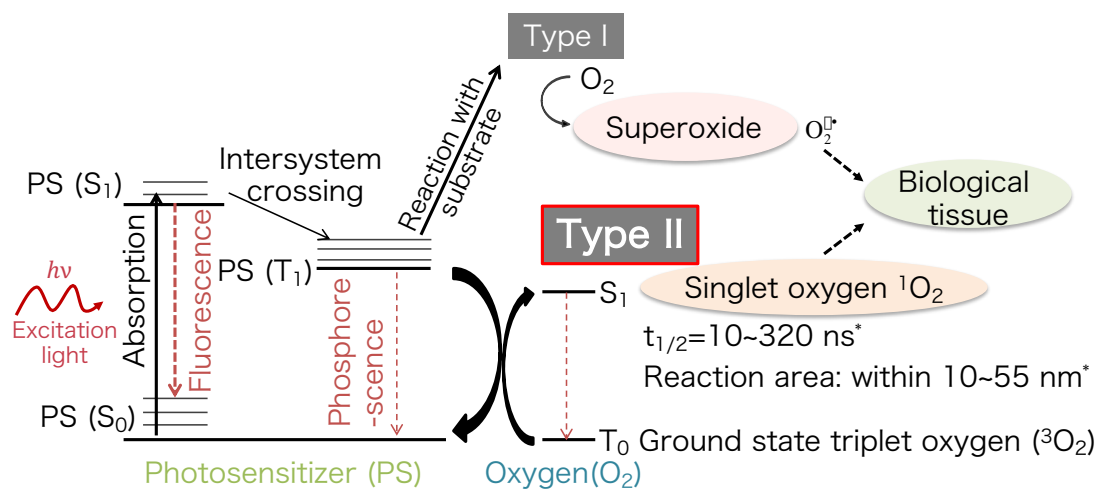


図 2-1 光増感反応におけるエネルギーダイアグラム [1-4]

表 2-1 種々の光感受性薬剤とその特徴 [1, 4]

構造 [4]	商標 [4]	物質名 [4]	励起波長 [1]
Porphyrin	Photofrin [®]	HpD	630 nm
	Photogem [®]		
	Levulan [®]	ALA	635 nm, 375-400 nm
	Metvix [®]	M-ALA	635 nm
	Hexvix [®]	H-ALA	
	Visudyne [®]	Vertiporfin, BPD-MA	689 nm
Texaphyrin	Antrin [®] , Lutex	Lutexaphyrin	732 nm
Chlorin	Foscan [®]	Temoporfin, m-THP	652 nm
	LS11, Photolon [®] , Litx ^T , Apoptosin TM , Laserphyrin	Talaporfin	664 nm
Phthalocianines	Photochlor	HPPH	665 nm
	Photosens [®] Pc4	Phthalocyanine	670 nm

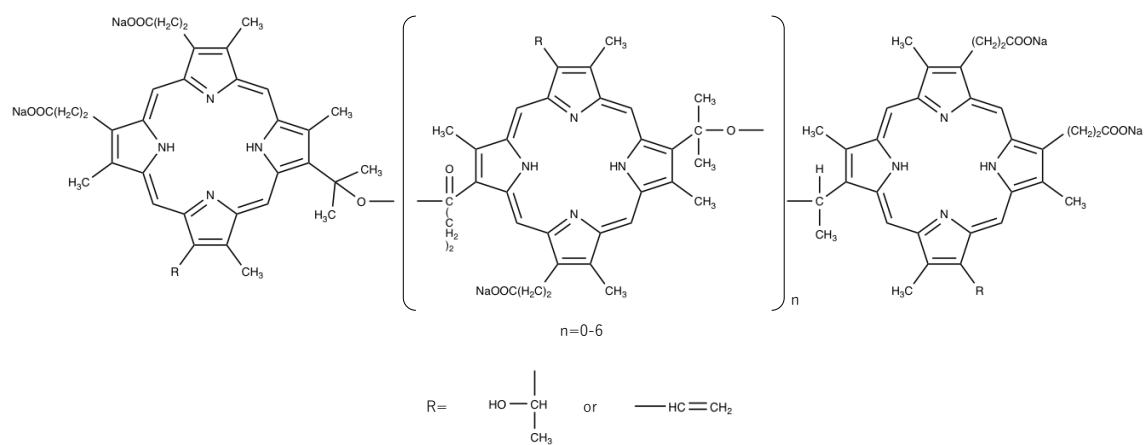


図 2-2 ポルフィマーナトリウムの化学構造 [23]

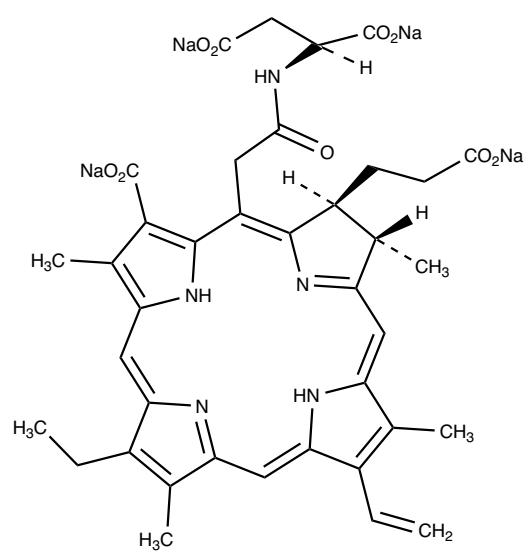


図 2-3 タラポルフィンナトリウムの化学構造 [19]

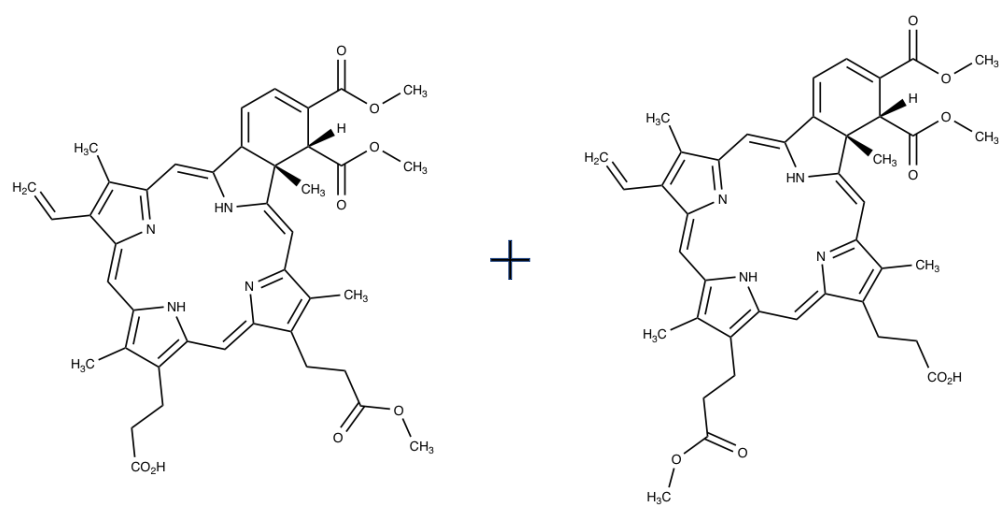


図 2-4 ベルテホルフィンの化学構造 [23]

3 II

3.1□
II

3

in vivo

in vitro

3.2□
II

3

[1, 2]

[2]

[1, 2]

[1]

II

[1, 2]

3.3 □

3.3.1 II

II

[3]

[3, 4]

1.5-2 kg

[5]

[3, 4]

2

[3, 4, 6]

4

[3, 6]

(i)

(ii)

(iii)

(iv)

(i)

[3]

(ii)

[3, 6, 7]

(iii)

[3, 6]

(PGI₂)

(NO)

[3, 4, 6]

3.3.2

(iv)

[5]

PGI₂

NO

3.3.2

II

3.3.2 II

II 3.3.1

3-1

[3, 4, 6]

[3]

3.3.1

(iii)

PGI₂

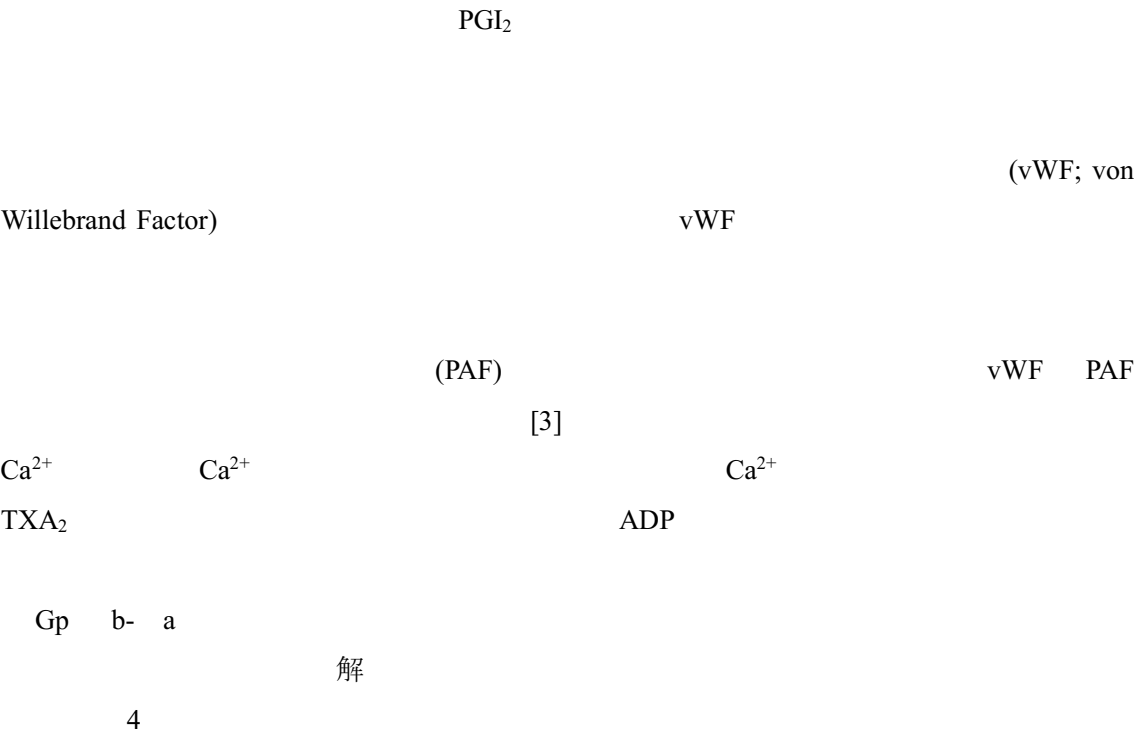
NO

II 3-2

PGI₂

NO

A₂ (TXA₂)



[8]

3.4 □

II

[9]

(2)

[9-12]

[13, 14]

II

(2.3.3 2.3.4)
in vivo
[14, 15]

[9]

3.5□

(DLI:

Drug Light Interval)

20 (3-3)

[16]

II

[9, 10]

(15-60 min, 2.3.4)

2

in vitro DLI

in vitro

2

in vitro

in vitro

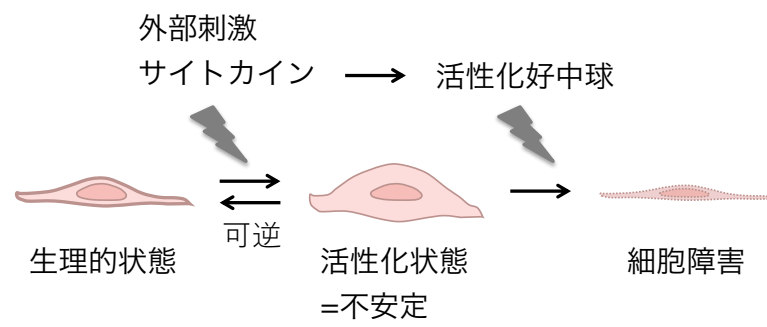
3.6□

II

in vitro

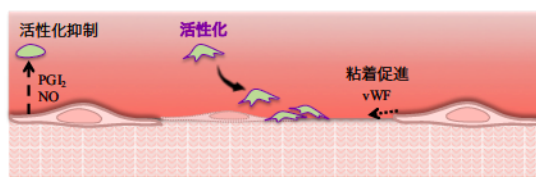
- [1] K. T. Patton and G. A. Thibodeau, , : , 2017, pp. 326-329.
- [2] , , : , 2017, pp. 62-65.
- [3] , 2 : , 1998, pp. 1-36.
- [4] , : , 1997, pp. 39-53.
- [5] , : , : , 2005, pp. 1-11.
- [6] , , : , 2004, pp. 21-62.
- [7] , , : , 2005, pp. 30-33.
- [8] , : 2017 pp. 16-17.
- [9] B. W. Henderson and T. J. Dougherty, "How does photodynamic therapy work?," *Photochem. Photobiol.*, vol. 55, pp. 145-157, 1992.
- [10] C. J. Gomer and A. Ferrario, "Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model," *Cancer Res.*, vol. 50, pp. 3985-3990, 1990.
- [11] J. S. Nelson, L. H. Liaw, A. Orenstein, W. G. Roberts, and M. W. Berns, "Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, and phthalocyanine," *J. Natl. Cancer I.*, vol. 80, pp. 1599-1605, 1988.
- [12] P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel, T. H. Foster, A. W. Girotti, S. O. Gollnick, S. M. Hahn, M. R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B. C. Wilson, and J. Golab, "Photodynamic therapy of cancer: an update," *CA Cancer J. Clin.*, vol. 61, pp. 250-281, 2011.
- [13] B. J. Tromberg, A. Orenstein, S. Kimel, S. J. Barker, J. Hyatt, J. S. Nelson, and M. W. Berns, "In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 52, pp. 375-385, 1990.
- [14] W. M. Star, H. P. Marijnissen, A. E. van den Berg-Blok, J. A. Versteeg, K. A. Franken, and H. S. Reinhold, "Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers," *Cancer Res.*, vol. 46, pp. 2532-2540, 1986.
- [15] M. W. Reed, D. A. Schuschke, D. M. Ackermann, J. I. Harty, T. J. Wieman, and F. N. Miller, "The response of the rat urinary bladder microcirculation to photodynamic therapy," *J. Urology*, vol. 142, pp. 865-868, 1989.

- [16]□L. Sheyhedin, K. Aizawa, M. Araake, H. Kumasaka, T. Okunaka, and H. Kato, “The effects of serum on cellular uptake and phototoxicity of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in vitro,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 68, pp. 110-114, 1998.

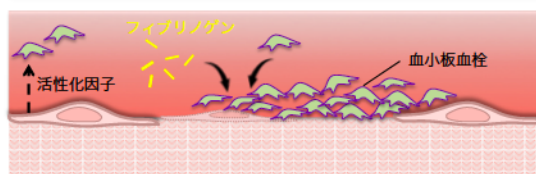


3-1 II

血小板の活性化
および粘着



一次血栓形成



二次血栓形成

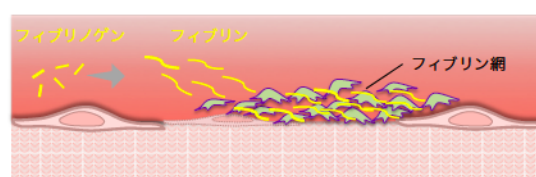
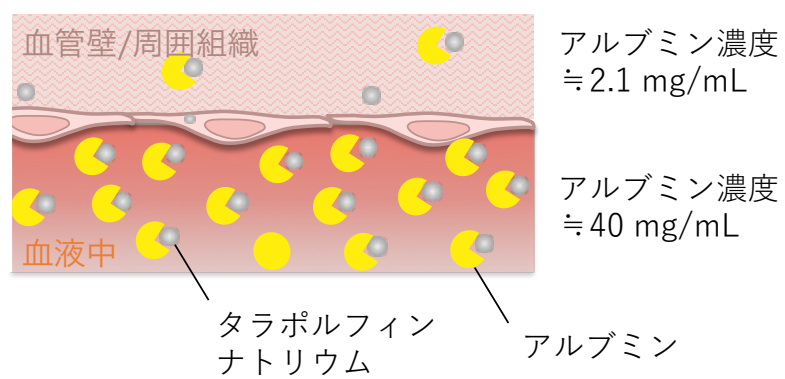


図 3-2 血管内皮細胞障害による血栓形成の様子



3-3 II

4 ±

4.1□

± 4

(15-60 min, 2.3.4)

4.2□

±

[1] 8% 4.5-5.5 L

[2] 2

45 [3]

1 55

4-1 90

[2]

4-2

[1, 4]

[3] pH 7.4 pH 0.1-0.2 pH

[1] pH

(i) -

(ii) - (iii) (iv)

[1]

[4]

290 mOsm/L

() 0.9 Na⁺

[3]

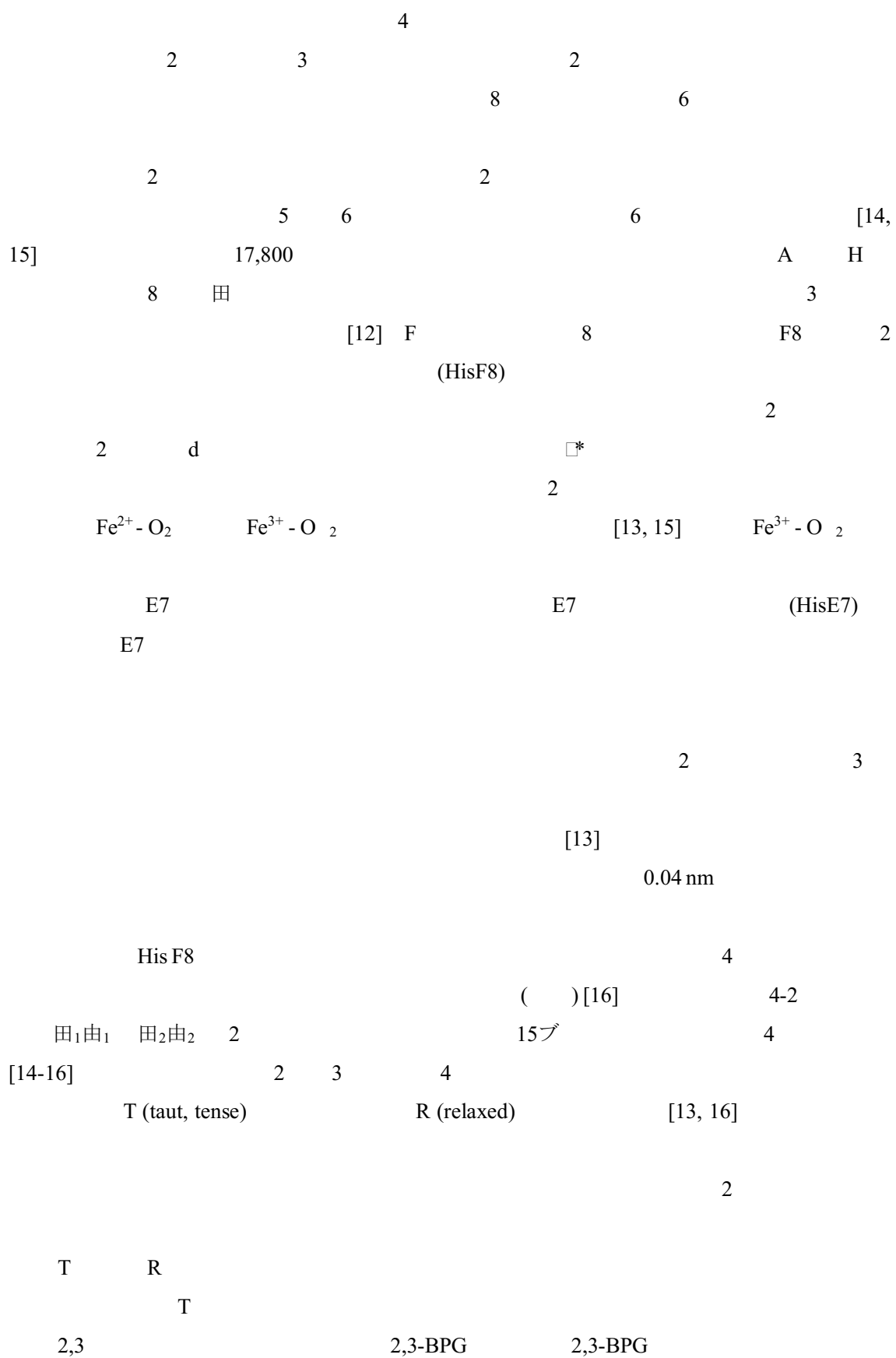
4-1

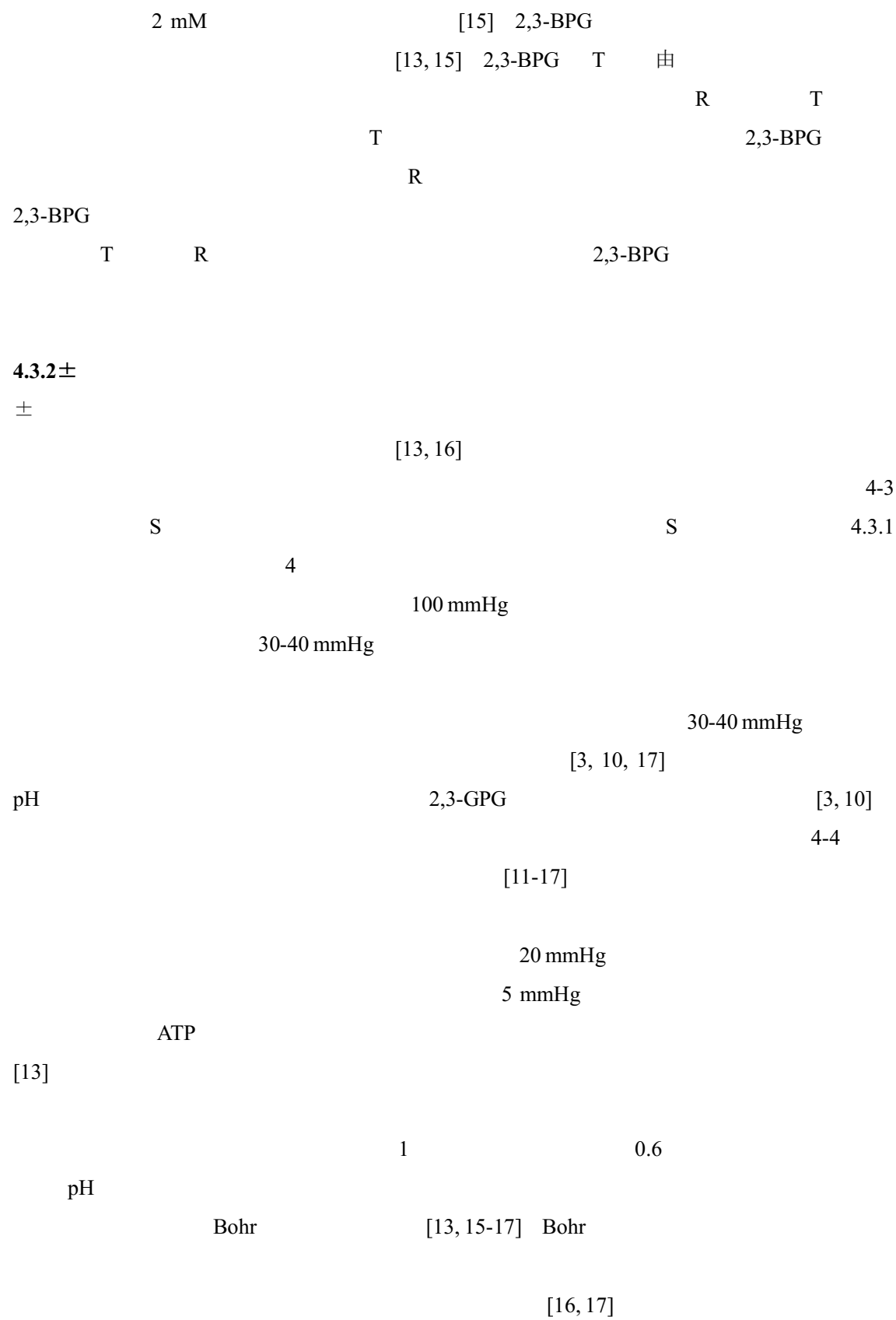
1.5-2.0 mOsm/L

4-1

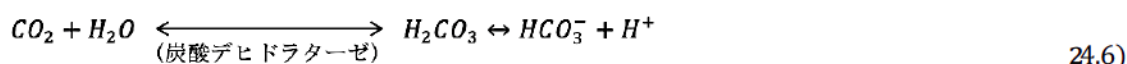
4-1

± [3] 8 μm 4-3 2.4 μm 1 μm [3] 30 [1, 2] 300 mOsm 130 mOsm 3 min pH 3 (ATP) [3, 5-8] 4-4 120 [2, 9] ATP [2, 3, 10] 4 3 [10] C (3-6 μm) (2-5 μm) [3] 4.3□ 4.3.1± 1 田 由 4 4 [11] 田 141 由 2 3 [12] [13] [12] 4-1 4 2 (Fe²⁺)





るアミノ末端のアミノ基と可逆的に反応して、負電荷を持つカルバミン酸基をつくる [14-17]。カルバミン酸基は、アミノ酸基を正電荷から負電荷に変える。これは α 様グロビン鎖と β 様グロビン鎖の間で塩橋を形成するのに好都合であり、T 型ヘモグロビンの構造を安定化させ酸素の解離が促進する [15, 16]。すなわち、活発な代謝により二酸化炭素を多く産生し二酸化炭素濃度が高い組織周囲にある毛細血管では T 状態の方が安定になり、その結果ヘモグロビンからの酸素放出が促進される [17]。二酸化炭素の全運搬量の 14%がこの反応によって運搬され、残りの大部分は炭酸水素イオンとして運搬される [14-16]。式 (4.6) に示すように赤血球内部で炭酸デヒドラターゼの酵素触媒による二酸化炭素の水和が起こると炭酸が生成する。さらに、炭酸は炭酸水素イオンとプロトンに解離し、pH が下がる [16]。



pH が低くなると、プロトンがヘモグロビンに取り込まれて T 状態を安定化するイオン対形成を促し、その結果ヘモグロビンから酸素が解離する。組織代謝により二酸化炭素濃度が高い毛細血管では、式 (4.6) が右向きに進みプロトンが放出され pH が低くなる。その結果、多くの酸素化ヘモグロビンの酸素結合が解離する。さらに、プロトンがヘモグロビンに取り込まれると、式 (4.6) の右向きが進み炭酸水素イオン生成が促進され、二酸化炭素は炭酸水素イオンとしての輸送が促進される。一方、空気吸入中 (吸息) の肺では二酸化炭素濃度が低いため、ヘモグロビンに酸素が簡単に結合してヘモグロビンの T 状態のイオン対を壊して R 状態への変換を促す。このとき、Bohr 効果により放出されるプロトンは炭酸水素イオンに再結合することで式 (4.6) の左向きの反応が進み、二酸化炭素を血液中から排出する。これらの反応が協調的に進むため、pH はほぼ変化しない [14, 17]。

単位血液に含まれる酸素の量は、ヘモグロビンの結合酸素量 (化学的な溶存酸素量) と血漿中の物理的な溶存酸素量により求めることができる。4.3.1 部よりヘモグロビン 1 分子あたり 4 分子の酸素と結合可能であるため、ヘモグロビン 1 g あたりに結合している酸素量 U_{O_2} は次の式 (4.7) で求められる。

$$U_{O_2} \text{ 2mL/g} = \frac{V_0 \times 4}{M_{H4}} \times C_{H4} \times \frac{SaO_2}{100} \quad (24.7)$$

ここで、 V_0 は標準状態におけるモル体積 (22.4 L/mol)、 M_{H4} はヘモグロビンの分子量 (64458 g/mol)、 C_{H4} はヘモグロビン濃度、 SaO_2 は酸素飽和度を指す [3, 18]。これより、血液 100 mL 中のヘモグロビン 15 g/dL が結合可能な酸素は 20.4 mL である。一方、血漿中の溶存酸素量はヘンリーの法則より酸素分圧に比例する。溶解度にあたるその比例定数は、37°C で 0.0031 mL/mmHg/100 mL である。これより、動脈血酸素分圧の 100 mmHg では、血液 100 mL に 0.3 mL の酸素が物理的に溶けている [17, 19]。以上より、ヘモグロビンによる化学的な溶存酸素量は、血漿中の物理的な溶存酸素量の 68 倍であり、血液が運搬する酸素の大部分はヘモグロビンと結合している [18-20]。

4.3.3±

±

[21]

[22-25]

B

2

3

4-5

[26]

4-6

(660 nm) (940 nm) 2 LED

2

[17-20]

4.4□

4.4.1±

[4, 10, 27]

[27]

[10]

4.4.2 溶血度測定方法

生体内における溶血は血流速や4.4.1節で述べた処理機構等が関与するため、*in vivo* ではその作用を定量的に評価することが困難である。このため、標準法として *in vitro* 実験法が採用されている。*in vitro* 実験での溶血測定は上清の吸光度測定や血球数測定が一般に用いられる [28, 29]。

血液に接触する可能性の高い医療機器もしくは原材料の溶血性を評価するための Good Laboratory Practice (GLP) 試験では血液試料の上清の吸光度による溶血度測定法が定められている。この試験法では、生理食塩水あるいは対象とする薬品を含む試験液と脱繊維血が 10 : 0.2 となるように混和し一定時間インキュベーションを行った後、750 × g で 5 分間遠心分離を行う。赤血球混濁液試料を遠心分離後、上清の吸収スペクトルを測定する。陰性対照液の生理食塩水、完全溶血液である陽性対照液の脱繊維血を蒸留水に混和した試料の吸収スペクトルの吸収スペクトルを測定する。赤血球混濁液試料の上清の吸収スペクトルが酸素化ヘモグロビン吸収スペクトルを示す場合は第Ⅰ法として、得られた上清の 540 nm もしくは 576 nm における吸光度を用いる。この波長は酸素化ヘモグロビンの極大吸収波長を示す。上清の吸収スペクトルがメトヘモグロビン等の吸収スペクトルを示す場合は第Ⅱ法として、上清のヘモグロビンを全てシアンメトヘモグロビンに変換する。試験上清液、陽性対照液および陰性対照液にそれぞれ強力なシアン化剤である Drabkin 溶液を混和させ、生成したシアンメトヘモグロビンの吸光度を極大吸収波長の 540 nm で測定する。第Ⅰ法および第Ⅱ法において測定した吸光度を用いて式 (4.8) により溶血度を測定する [28, 29]。

$$H = \frac{A_{\text{sa0 ple}} - A_{\text{Ref salinL}}}{A_{\text{Ref hLmolysis}} - A_{\text{Ref salinL}}} \times 100 \quad (24.8)$$

ここで、 H は溶血度 [%]、 $A_{\text{sa0 ple}}$ は試験上清液、 $A_{\text{Ref salinL}}$ は陰性 (非溶血) 対照液上清液、 $A_{\text{Ref hLmolysis}}$ は陽性 (完全溶血) 対照液上清の吸光度を指す。溶血の安全性は表 4-5 に示す判定表を用いて評価する [28]。

血球計数装置は顕微鏡による血球数算定を自動化したもので、原理的に再現性が高い。その後、血球計数装置は血球の形態分類の自動化もできる血球分析装置へと発展した。血球分析装置の基本原理は、電気抵抗法あるいは光学分析法による計測を用いる。電気抵抗法と光学分析法はどちらも一長一短がある。電気抵抗法は体積情報を取得するため 3 次元であるのに対し、光学分析法は面積情報を反映するため 2 次元である。これより、分離感度は原理的には電気抵抗法の方が光学分析法よりも良い。一方で、電気抵抗法は寸法情報のみを取得するのに対し、光学分析法では寸法情報に加えて形状の情報も合わせて取得できる。このため光学分析法では白血球の分類も可能である。さらに、分光情報により細胞内のヘモグロビン量を同時に測定できる。最近では、光学分析法への移行が急速に進んでいる [30-33]。

4.4.3±

±

[34,35]

(4.4.1)

in vitro

[36]

in vitro

[37,38]

(4-8)

1 2

[36,39]

4.5□

in vitro

4-9

[40] 4-5

[26]

(4.3.2) [11-16]

pH

(4.3.2) [41]

[18-20]

[42]

$\pm 4.4.3$

in vitro

[3]

[43]

[17, 18]

in vitro

4.6□

\pm

- [1]□ , , : , 2007, p. 433.
- [2]□ , : 2017 pp. 2-3 8-43.
- [3]□ , 15 , : , 1990, pp. 1-88.
- [4]□ , , : , 2013, pp. 75-93.
- [5]□ B. Deuticke, "Transformation and retransformation of ionic environment." *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 163, pp. 499-550, 1968.
- [6]□ M. P. Sheetz, R. G. Painter, and S. J. Singer, "Biological membranes as bilayer couples Compensatory shape changes induced in membranes," *Cell Biol.*, vol. 70, pp. 193-203, 1976.
- [7]□ M. Nakao, T. Nakao, and S. Yamazoe, "Adenosine triphosphate and maintenance of shape of the human red cells," *Nature*, vol. 187, pp. 945-946, 1960.
- [8]□ K. T. Patton, and G. A. Thibodeau, , : , 2017, pp. 292-305.
- [9]□ , , , ∇ , : , 1994, pp. 19-67, 89-109.
- [10]□ , , : , 1998, pp. 114-141.
- [11]□ H. R. Matthews, R. A. Freedland, and R. L. Miesfeld, , : , 2000, pp. 53-65.
- [12]□ C. K. Mathews, D. E. V. Holde, D. R. Appling, and S. J. Anthony-chahill, , : , 2015, pp. 209-231.
- [13]□ L. A. Moran, H. R Horton, K. G. Scrimgeour, and M. D. Perry, , : , 2013, pp. 102-113.
- [14]□ J. L. Tymoczko, J. M. Berg, and L. Stryer, , : , 2010, pp. 107-117.
- [15]□ V. W. Rodwell, D. A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, and P. A. Weil, , : , 2016, pp. 57-66.
- [16]□ D. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt, , : , 2017, pp. 118-133.
- [17]□ , , : , 2006, pp. 4-106.
- [18]□ , , : , 2007, pp. 22-23.
- [19]□ \pm ;

<https://www.konicaminolta.jp/healthcare/products/pulseoximeters/knowledge/information/pdf/s>

po2.pdf (2018/10/27).

- [20]□ , , : , 1989.
- [21]□ , , , : , 1998, pp. 10-189.
- [22]□W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch, "A review of the optical properties of biological tissues," *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. 26, pp. 2166-2185, 1990.
- [23]□S. V. Tsinopoulos, E. J. Sellountos, and D. Polyzos, "Light scattering by aggregated red blood cells," *Appl. Opt.*, vol. 41, pp. 1408-1417, 2002.
- [24]□P. Mazon, J. Didelon, S. Muller, and J. Stoltz, "A theoretical approach of the measurement of osmotic fragility of erythrocytes by optical transmission," *Photochem. Photobiol.*, vol. 72, pp. 172-178, 2000.
- [25]□J. R. Murphy, "Erythrocyte metabolism. VI. Cell shape and the location of cholesterol in the erythrocyte membrane," *Lab. Clin. Med.*, vol. 65, pp. 756-774, 1965.
- [26]□P. V. A. Pamidi, M. DeAbreu, D. Kim, and S. Mansouri, "Hydroxocobalamin and cyanocobalamin interference on co-oximetry based hemoglobin measurements," *Clin. Chim. Acta*, vol. 401, pp. 63-67, 2009.
- [27]□ , , : , 1987.
- [28]□ 0301 20 , " , "± 24 3 1 .
- [29]□ GLP : pp. 154-155, 2008.
- [30]□ , , □ (, ,), : , 2006, pp. 72-91.
- [31]□*Means for counting particles suspended in a fluid*, U.S. Patent No. 2, p. 656, p. 508, 1953.
- [32]□W. H. Coulter, "High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer," *Proc. Natl. Electron Conf.*, vol. 12, 1956.
- [33]□ , , : , 1991, pp. 19-28.
- [34]□A. A. Frolov and G. P. Gurinovich, "The laws of delayed photohaemolysis sensitized by chlorin e6," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 13, pp. 39-50, 1992.
- [35]□L. I. Grossweiner, J. M. Fernandez, and M. D. Bilgin, "Photosensitisation of red blood cell haemolysis by photodynamic agents," *Lasers Med. Sci.*, vol. 13, pp. 42-54, 1998.
- [36]□Meiji Seika , □ 100 mg, , 2016 6 (10).
- [37]□M. J. Niedre, A. J. Secord, and M. S. Patterson, B. C. Wilson, " In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy," *Cancer Res.*, vol. 63, pp. 7986-7994, 2003.

- [38] E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, "Detailed in vitro study of the photosensitization reaction of extracellular talaporfin sodium in rat myocardial cells," *Lasers Surg. Med.*, vol. 45, pp. 660-667, 2013.
- [39] P. Vaupel, F. Kallinowski, and P. Okunieff, "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review," *Cancer Res.*, vol. 49, pp. 6449-6465, 1989.
- [40] E. L. P. Larsen, L. L. Randeberg, O. A. Gederaas, H. E. Krokan, D. R. Hjelme, and L. O. Svaasand, "In vitro study on methemoglobin formation in erythrocytes following hexyl-aminolevulinate induced photodynamic therapy," *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XV*, vol. 6427. International Society for Optics and Photonics, 2007.
- [41] J. W. Severinghaus, "Blood gas calculator," *J. Appl. Physio.*, vol. 21, pp. 1108-1116, 1966.
- [42] L. S. L. Arakaki and D. H. Burns, "Multispectral analysis for quantitative measurements of myoglobin oxygen fractional saturation in the presence of hemoglobin interference," *Appl. Spectrosc.*, vol. 46, pp. 1919-1928, 1992.
- [43] , , , 1977, pp. 1-25.

4-1 ±	[2]
±	
± (91%)	
±	(4.06%)
(7%)	(2.66%)
	(0.28%)
± (1%)	
	(1%)

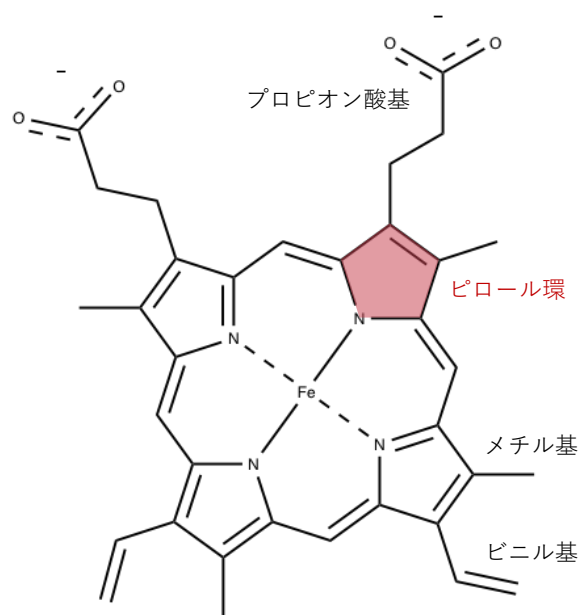
4-2 ±		[3]	
	() 1.06-1.06	1.03	1.10
	() 1.05-1.06	(:1.02-1.03)	
(cal/(deg*g))	0.92	0.94	0.77
pH	7.37-7.46	7.37-7.46	0.1-0.2
	() 4.74	1.72-2.03	
	() 4.40	(:1.70-2.00)	

4-3 ±		[3]	
[m]	[μm]	[μm ³]	[μm ²]
7-8	± 2	83	145
	± 1		

4-4

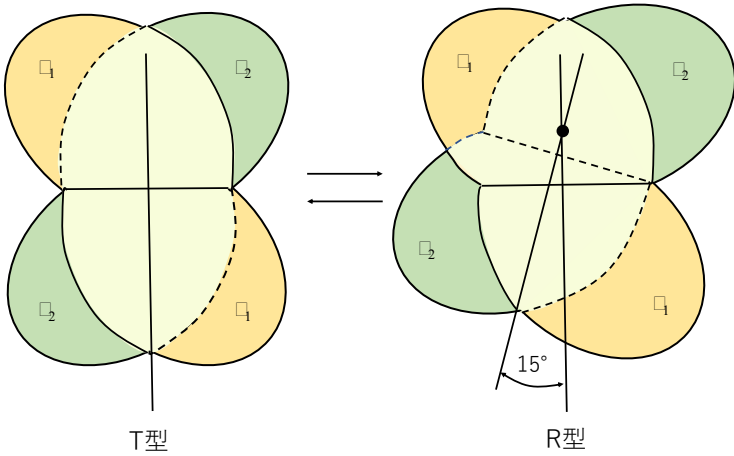
[3]

	(mg/mL)	(mg/g)
	721 \pm 17.3	230
	371	466
	9.2	450
	352.0	
	6.3	
	2.9	
	5.1 \pm 0.5	
	2.98 \pm 0.2	
	0.56	
	1.20 \pm 0.08	
	2.0	
	0.92 \pm 0.18	
	(μ mol/mL)	
	78 (111 m mol/L 乱H ₂ O)	
	92.6 (132 m mol/L 乱H ₂ O)	
	8.3 (11.9 m mol/L 乱H ₂ O)	
	3.1 (4.4 m mol/L 乱H ₂ O)	
	0.017 (0.02 m mol/L 乱H ₂ O)	
	0.5 (0.7 m mol/L 乱H ₂ O)	



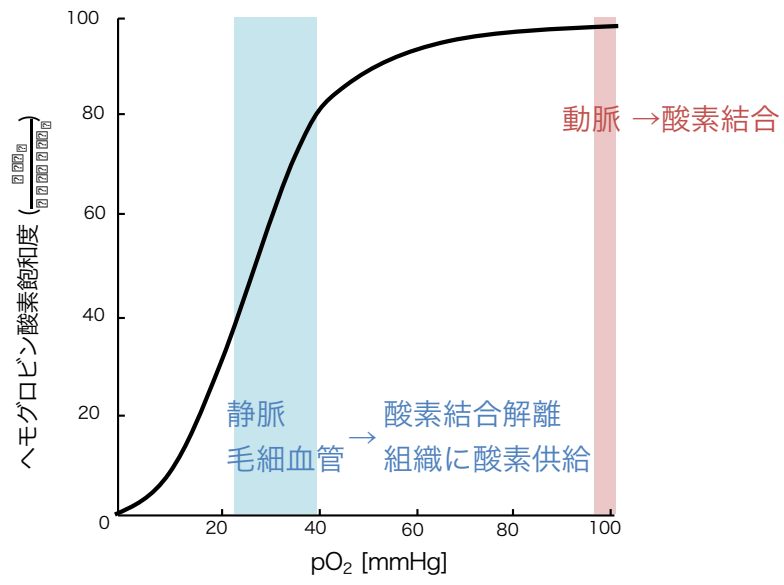
4-1 ±

[12]



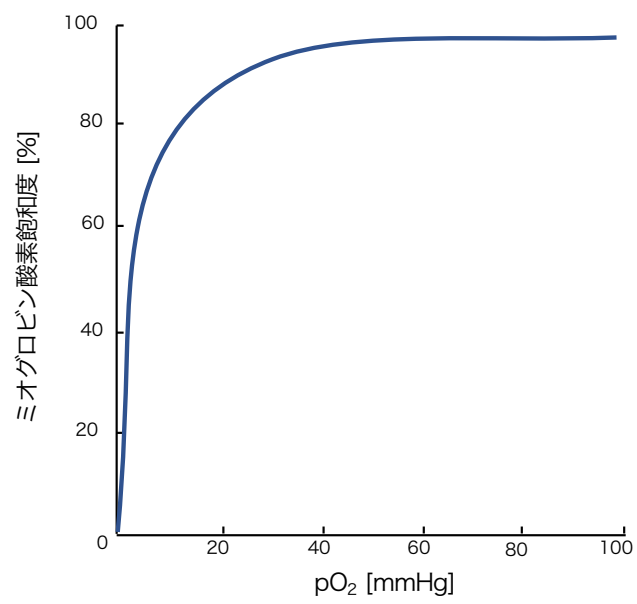
4-2 ±

[15]



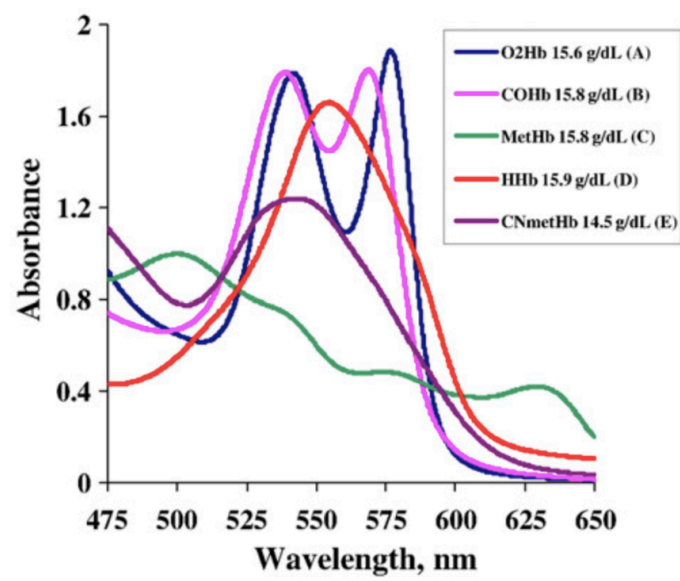
4-3 ±

[3, 10, 17]

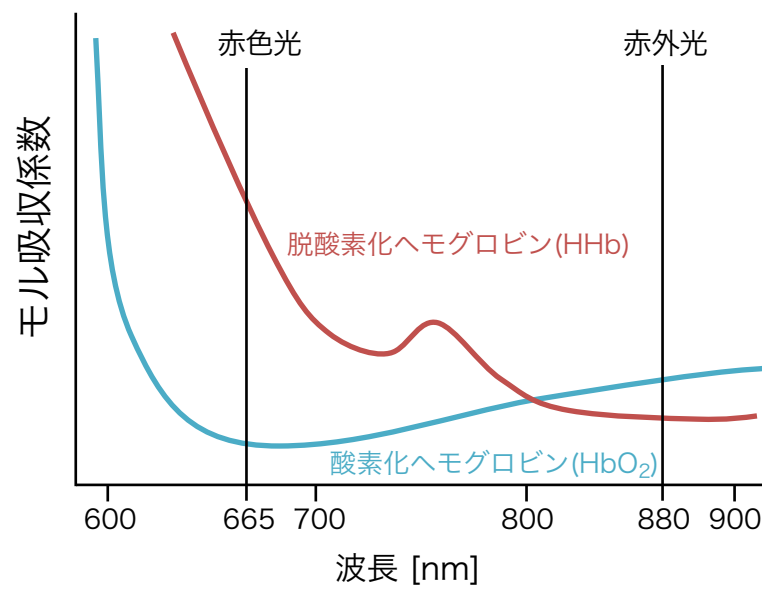


4.4 ±

[13]



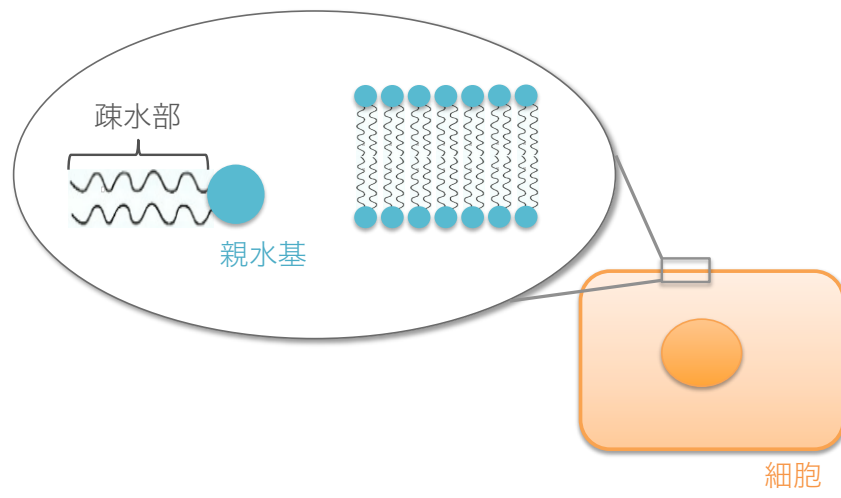
4-5± ([26])



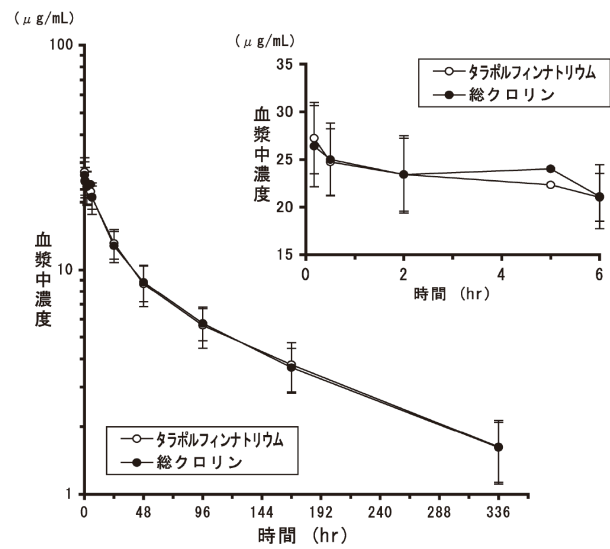
4-6±

[19]

4-5 ± [29]	
	□2
2	□10
10<	□20
20<	□40
40<	



4-7 ±



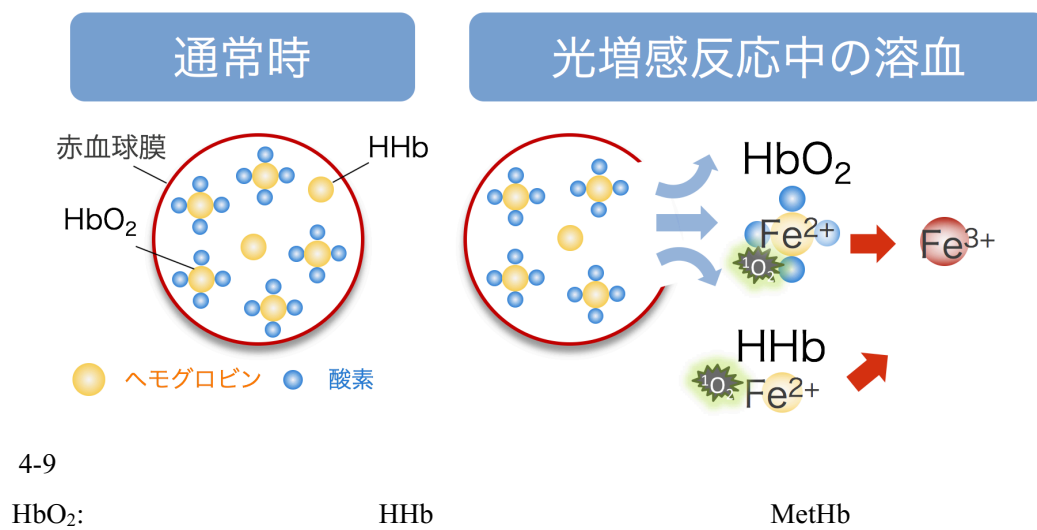
(平均値±標準偏差、n=9)

4-8

40 mg/m² (1mg/kg)

([36]

)



5 Φ *in vitro* *in vivo*

5.1 Φ
5 (15-60 min, 2.3.4)
(i) *in vitro*
(ii) *in vivo*

5.2 Φ *in vitro*

2 5.3 *in vitro*
5.2

5.2.1 Φ
35 mm (3000-035, IWAKI,)
(Human Umbilical Vein Endothelial Cells ; C-12200,
Promocell, ,) 10⁴ cells/cm² Endothelial
Cell Growth Medium 2 Kit (C-22111, Promocell, ,) 2.5 mL
HUVECs 37 5% CO₂ 5
1 HUVECs 1
5 100
Endothelial Cell Growth Medium 2 Kit (C-22216, Promocell, ,
) 2 Supplement Pack (C-39211, Promocell, ,
) ECGM+ EGCM+
(Meiji Seika ,) 20 □g/mL
40 mg/m²
10 27 □g/mL [1] 5
2.5 mL
(37 , 5% CO₂)
5 10 30 60 120 min
2 () Wash 2

Wash ECGM+
HUVECs Soret
400±20 nm (DP80, ,
(IX70, ,) 5 s 10
600 nm
ImageJ 5-1
10

5.2.2 Φ

HUVECs
5-2 30 min 30-120
min
5-2

5.3 Φ
vitro

5
in vitro
5.3
20 2
(~2 hr)

5.3.1 Φ

96 5-3
663 nm (Rouge-LD-01B,
Q
[2] 273 μm NA: 0.22 FC-SMA
(Beam View Analyzer,
,)

4 4

5-4 (PS19Q,

5

(5.2.1)

6.9 mm 96 (NCO3904, ,)

10^4 cells/cm² 5.2.1 5

100 μ L

Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (Invitrogen, ,

) 10% Fetal Bovine Serum (Invitrogen, ,) 100 unit/ml

Penicillin (Invitrogen, ,) 100 μ g/ml Streptomycin (Invitrogen, ,

2.1 mg/mL

DMEM+ EGMC+ (A9731-10G,

SIGMA-ALDRICH, ,)

40 mg/mL 2.1 mg/mL 40 mg/mL

20 μ g/mL

5

100 μ L (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) 15

30 60 120 min 5-3

HUVECs 60 mW/cm²

10-20 J/cm² 60 min

30-120 mW/cm²

2.5-40 J/cm²

WST WST

[3]

WST Cell Counting Kit-8 (CK04, ,)

CCK-8 WST 2 (2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

5-5 WST-8 WST-8

WST-8

WST-8

DMEM+ CCK-8 10:1 0.1 ml/well

ュベータ (37°C, 5% CO₂) 内で2時間培養した。WST-8 ホルマザンは図 5-6 のような吸収スペクトルを持つため [3]、タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトルを考慮し、各ウェル溶液の波長 450 nm における吸光度を CCK-8 接触2時間後に測定した。このとき、攪拌を意図して吸光度測定の前にウェルプレートに 15 秒間振動を機械的に与えた。得られた吸光度を用いて、以下の式 (5.1) より死細胞率 R_{DC} [%]を求めた。

$$R_{DC} = \frac{A_{ac} - A_{\text{measu. ed}}}{A_{ac} - A_{dc}} \times 100 \quad \text{c5.1)}$$

ここで、死細胞 100%、死細胞 0%の吸光度をそれぞれ A_{dc} 、 A_{ac} とし、測定した吸光度を $A_{\text{measu. ed}}$ とした。放射照度 120 mW/cm²、放射照射量 72 J/cm² 照射したときに細胞が完全死することを、全細胞核染色液である Hoechst 33342 (H342, 同仁化学研究所, 熊本) および死細胞の核酸染色液である Propidium iodide (P378, 同仁化学研究所, 熊本) を用いた予備実験において確認した。この条件の光増感反応を行った細胞群の吸光度を死細胞 100%における参照値とし、薬剤に接触のみで光照射を起こさない細胞群の吸光度を死細胞 0%における参照値とした。

5.3.2 実験結果

図 5-7 に薬剤接触時間に対する各放射照射量およびアルブミン濃度での光増感反応による血管内皮細胞の死細胞率を示す。アルブミン濃度 2.1 g/L の薬剤溶液において、同じ放射照度における薬剤接触時間条件間の p 値は、一部の条件以外は p 値が 0.1 以上であり有意差内で同じであった。放射照射量 40 J/cm² における薬剤接触時間 60 min と 120 min 間の p 値は 0.05 以下であり有意差を得た。アルブミン濃度 40 g/L の薬剤溶液において、薬剤接触時間条件間の p 値は、一部の条件以外は p 値が 0.1 以上であり有意差内で同じであった。放射照射量 40 J/cm² における薬剤接触時間 15 min と 30 min 間の p 値は 0.05 以下であり有意差を得た。一部に有意差が認められたものの、薬剤接触時間に依存する死細胞率変化は確認されなかった。図 5-8 に放射照射量に対する各放射照度およびアルブミン濃度での光増感反応による血管内皮細胞の死細胞率を示す。アルブミン濃度 2.1 g/L の薬剤溶液での実験では、放射照射量の増加に伴い死細胞率が単調に増加し、20 J/cm² において死細胞率がほぼ 100%であった。一方、アルブミン濃度 40 g/L の薬剤溶液での反応では、40 J/cm² においても死細胞率がほぼ 0%で大部分が生存していた。

5.4 薬剤投与後早期の健常血管への光増感反応による血管内皮細胞障害 *in vivo* 実験

5.3 部で行った生体環境を考慮した *in vitro* 実験結果に対して、*in vivo* での障害性と比較するために、光感受性薬剤投与後早期のイヌ健常血管に励起レーザ光を照射したときの血管内皮細胞の障害性を標本観察により調査する。

5.4.1 実験方法

この実験はヘルシンキ条約および動物愛護法に基づき、実験を施行した(株)アイビーテック(東京,日本)の生命倫理規約を遵守して十分な麻酔によって動物に苦痛を与えないように行った。塩酸ケタミン注射液(ケタラル; 第一三共プロファーマ, 東京)を10 mg/kgと塩酸キシラジン(セラクタール; バイエル薬品株式会社, 東京)を2 mg/kg注射して鎮静させ、5%イソフルラン(フォーレン; アボットジャパン株式会社, 東京)と100%酸素の麻酔ガスを流量1.5-2.0 L/minで導入して麻酔下に置いた。気管挿管を行い、2%イソフルランの麻酔混合ガスを流量1.5-2.0 L/minで導入して吸入麻酔に切り替え、実験中全身麻酔状態を維持した。ビーグル犬(体重約9.2 kg, 月齢10ヶ月)の左右の頸静脈を外科的に露出させた。拡散プローブとして70 mmの拡散長をもつ250 μm Φ のプラスチック光ファイバーに800 μm Φ の細径PEBAX[®]透明チューブを外装させたものを用いた。この自作の拡散プローブは70 mmの拡散長において円周方向と軸方向において拡散光のばらつきが25%以下で均一に照射する構造をもつ。拡散プローブを血流方向に沿って頸静脈の外膜に接置した。タラポルフィンナトリウムを生理食塩水(大塚生食, 大塚製薬工場, 東京)に溶解し、2.5 mg/kgの濃度にて橈骨静脈より投与した。薬剤投与30 min後に、波長663 nmの赤色レーザ光を単位長さあたりの拡散体単位長さ当たりの放射光パワー21 mW/cmで167 sおよび667 s間照射した。線状光拡散体を用いた研究では、照射量表示法として単位長さあたりの投入光パワーの単位mW/cmが一般に用いられる[4, 5]。21 mW/cmのとき、拡散プローブのチューブ外側表面における放射照度は84 mW/cm²と見積もられる。式(5.2)を用いて血管外膜側から血管内皮細胞に伝わる放射照度を算出した[6]。

$$I(z) = I_0 \exp(-\mu_{\text{eff}} z) \quad (5.2)$$

ここで、本5.4部の実験において z は血管外膜を基準点として血管内膜方向に向かう距離を示し、 $I(z)$ は距離 z における放射照度とした。 μ_{eff} は組織内における光の吸収係数と多重散乱により求めた実行的な減衰係数である。生体の光学特性の表示法に関する詳細は、付録Bに記す。組織標本より求めたイヌの頸静脈厚みは $570 \pm 40 \mu\text{m}$ であった。ヒト大動脈の波長632.8 nmにおける μ_{eff} の報告値 8 cm^{-1} [7]を用い血管内皮細胞への放射照度を算出したところ、 $53 \pm 2 \text{ mW/cm}^2$ であった。励起レーザ光照射時の血漿中薬剤濃度を以下の方法で得た。左橈骨静脈より採血した血液に対して4°C、回転数3500 rpm(1917 g)で5 min遠心分離機(テーブルトップ冷却遠心機 2800, 久保田商事, 東京)により遠心分離した。上澄み液のタラポルフィンナトリウムのQ帯に相当する波長670 nmにおける吸光度を微量分光光度計(Colibri Microvolume Spectrometer, フナコシ, 東京)を用いて測定した。得られた吸光度に対し、予め求めた40 mg/mLのアルブミン濃度溶液を溶媒としたときの薬剤濃度と吸光度の関係を示す式(5.3)の検量線を用いて濃度換算した

$$y = 0.04x + 0.21 \quad (5.3)$$

ここで、 y は吸光度、 x は濃度 [$\mu\text{g/mL}$] を示す。

SRL (,)
BCG 30 min
10
2 mm
von Willebrand Factor
(5.2.1)

5.4.2Φ

von Willebrand Factor 5-9
14 g/mL 30 mg/mL
(5-9 (a)) 167 s 9 J/cm²
(5-9 (b))
667 s 35 J/cm² (5-9 (c))

5.5Φ Limitation

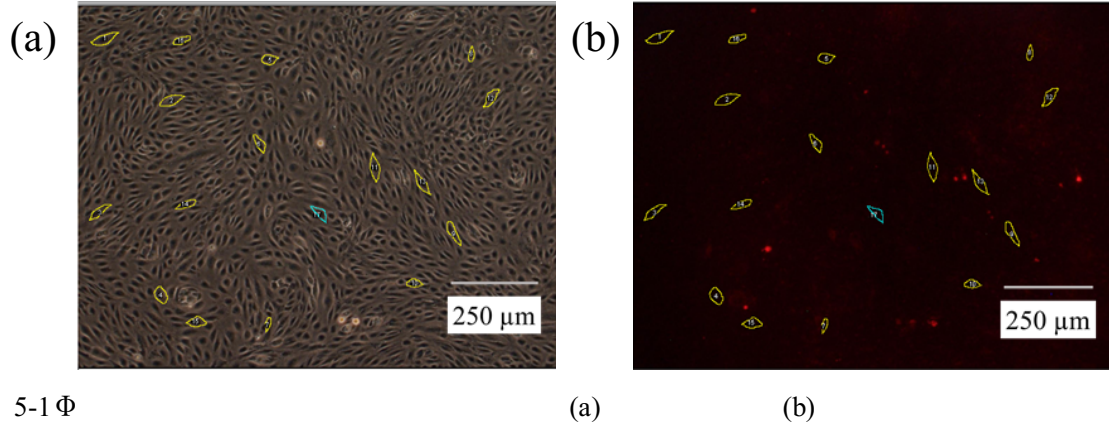
(5-2) (5-7)
5.3
in vitro
5.3 *in vitro*
2
40 mg/mL
2.1 mg/mL
5-8 [8, 9]
[10]
2.1-40 mg/mL 5-9 *in vivo*
in vitro
in vitro

-
- (i) □ HUVECs 5 *in vitro* *in vivo* *in vitro*
- (ii) □ 2 *in vivo* 30 min *in vitro*
- (iii) □ *in vivo* von Willebrand Factor
- (iv) □ *in vitro*
- (v) □ *in vitro*

5.6 Φ

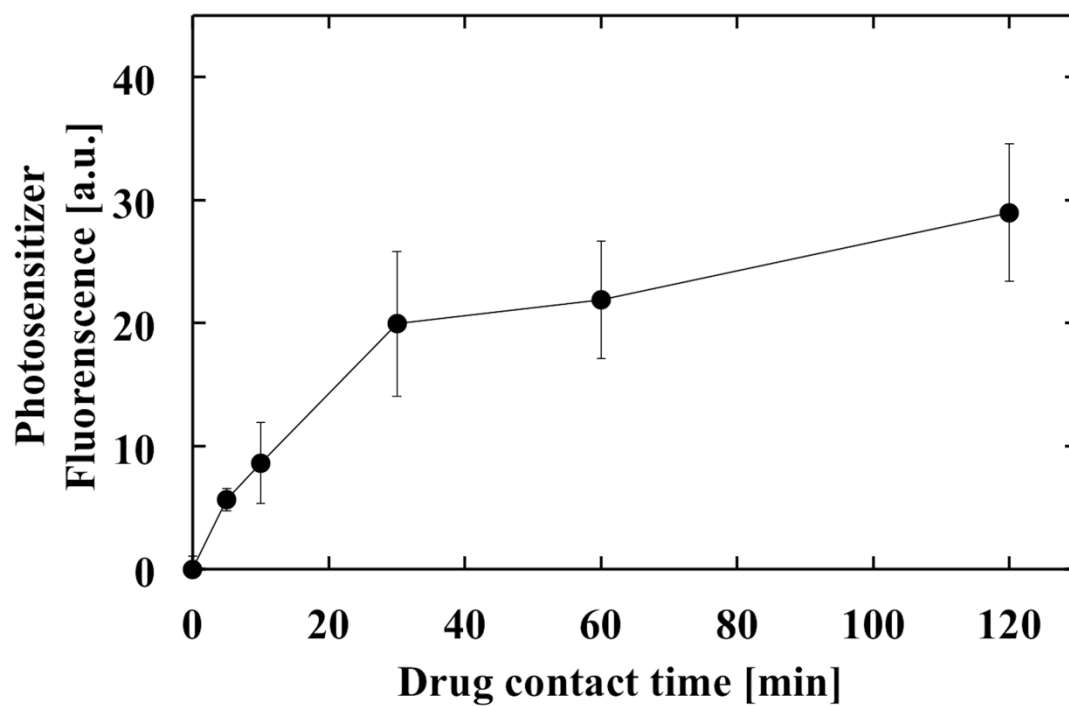
- 5
- (i) *in vitro* 2 *in vivo*
- (ii) *in vitro* *in vivo*

- [1] □Meiji Seika , □ 100 mg, , 2016 6 (10).
- [2] □J. D. Spikes and C. B. Jerry, “Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors,” *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 17, pp. 135-143, 1993.
- [3] □Dojindo Technical Information ;
 http://www.dojindo.com/TechnicalManual/Manual_CK04.pdf (2018/10/26).
- [4] □H. J. Nyst, R. L. P. Van Veen, I. B. Tan, R. Peters, S. Spaniol, D. J. Robinson, F. A. Stewart, P. C. Lavendag, and H. J. C. M. Sterenborg, “Performance of a dedicated light delivery and dosimetry device for photodynamic therapy of nasopharyngeal carcinoma: phantom and volunteer experiments,” *Lasers Surg. Med.*, vol. 39, pp. 647-653, 2007.
- [5] □M. C. Teichert, J. W. Jones, M. N. Usacheva, M. A. Biel, “Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model,” *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, vol. 93, pp. 155-160, 2002.
- [6] □W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch, “A review of the optical properties of biological tissues,” *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. 26, pp. 2166-2185, 1990.
- [7] □A. J. Welch and M. J. Van Gemert, *Optical-Thermal Response of Laser-irradiated Tissue* (vol. 2), Berlin: Springer, 2011, p. 280.
- [8] □T. Tsuchida, K. Aizawa, C. Konaka, and H. Kato, “Interaction of bovine serum albumin with mono-L-aspartyl chlorin e6 by spectrophotometry,” *Lasers Life Sci.*, vol. 5, pp. 155-164, 1993.
- [9] □L. Sheyhedin, K. Aizawa, M. Araake, H. Kumasaka, T. Okunaka, and H. Kato, “The effects of serum on cellular uptake and phototoxicity of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in vitro,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 68, pp. 110-114, 1998.
- [10] □W. Kapit and L. M. Elson, , : , 2015, pp. 8-16.

5-1 Φ

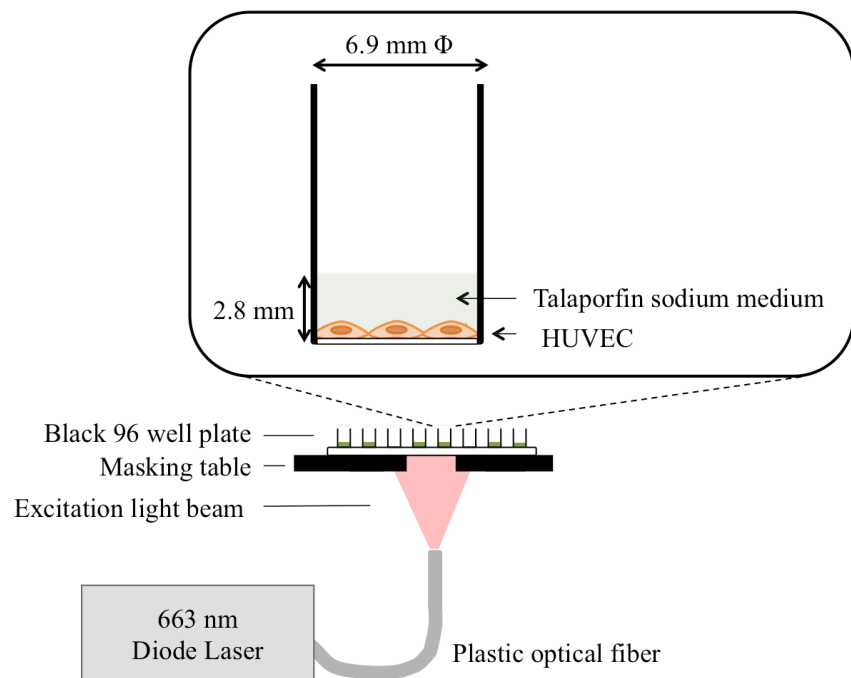
10

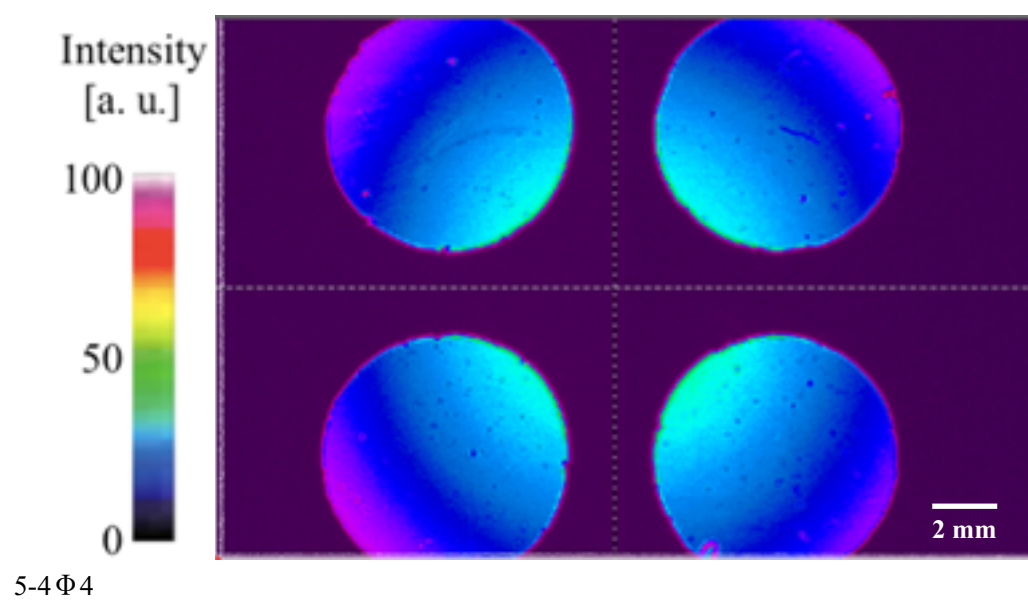
(5 s)

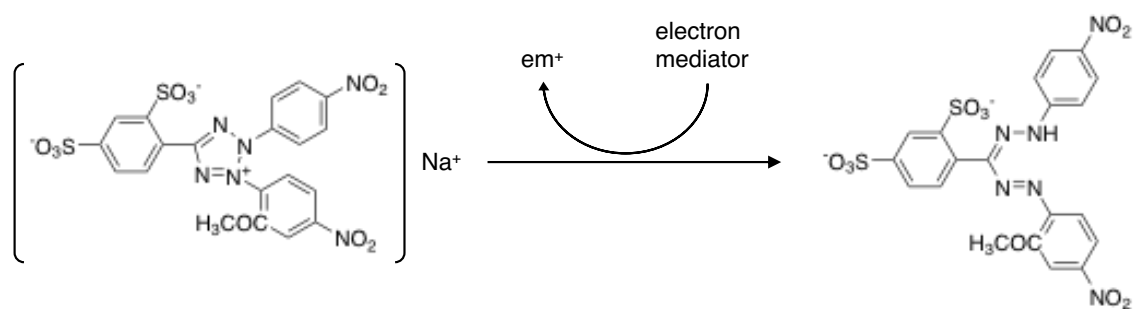


5-2 Φ

(N=10)

5-3 Φ



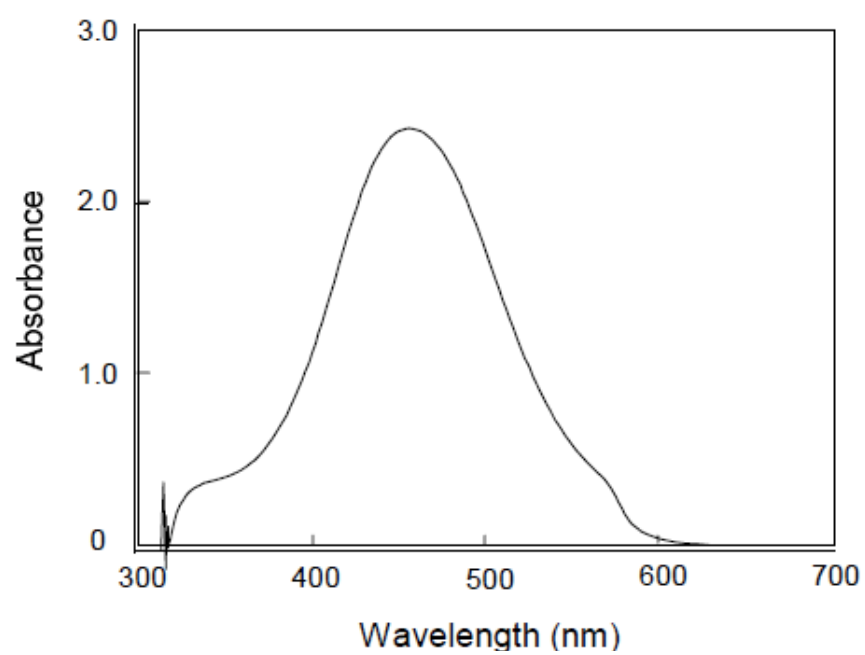


WST-8

WST-8 formazan

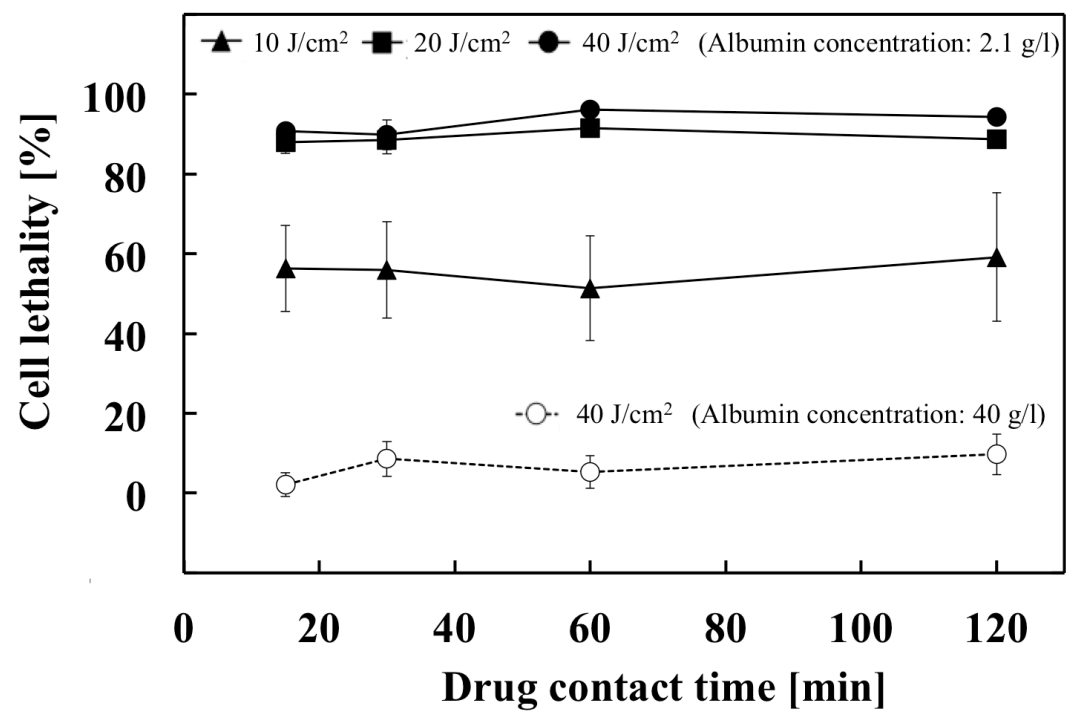
5-5 Φ WST-8

[3]



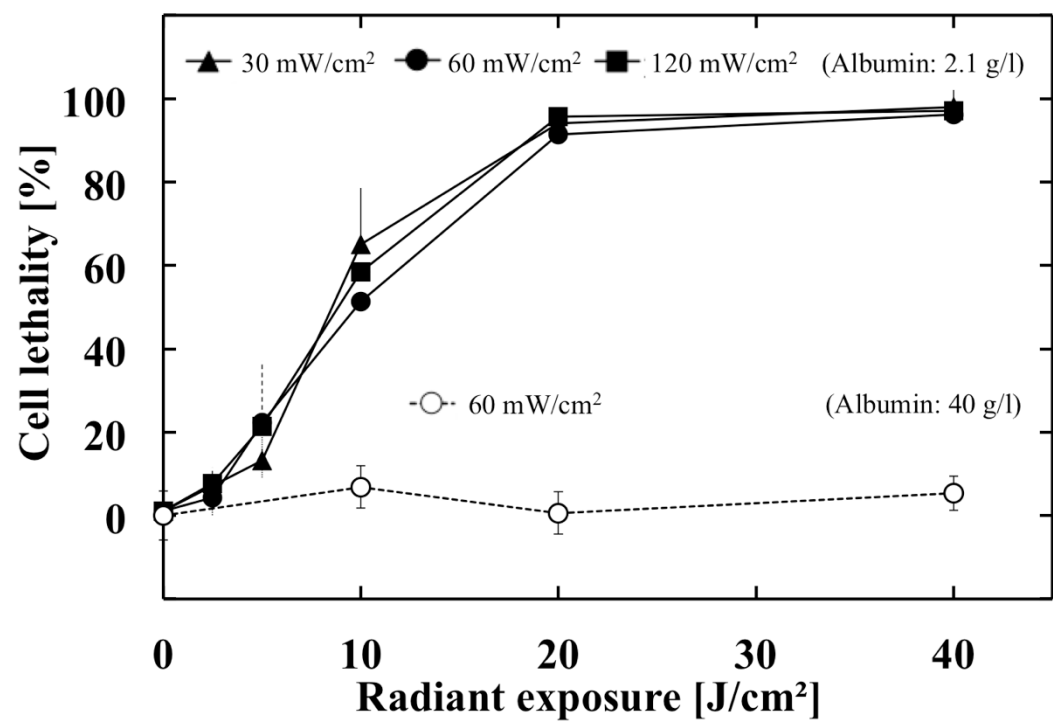
5-6ΦWST-8

([3])

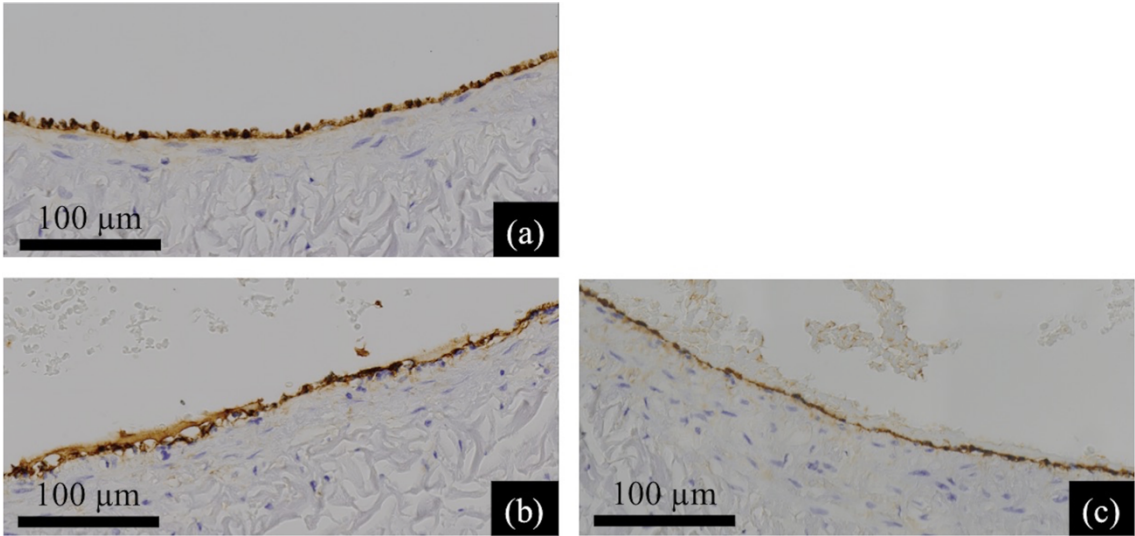


5-7Φ

(N=4-8)



5-8 Φ
(N=8)



5-9 Φ von
Willebrand Factor (a) (b) 21mW/cm, 167 s (8.9 J/cm²) (c) 21 mW/cm, 667 s
(35.4 J/cm²)
30 min 14 \square g/mL
30 mg/mL

第6章 赤血球に対する光増感反応作用 *in vitro* 検討における連続計測装置の開発

6.1 緒言

光増感反応による赤血球膜破裂およびヘモグロビンの酸化進行を、反応速度を支配する酸素の情報と併せて経時的に明らかにすることを目的に、ヘモグロビン分光に着目した提案計測法の原理に関して4.5部で述べた。第6章では、この原理に基づいた計測を行うための試料条件の選定を行い、提案計測法に基づく経時計測系を構築する。計測系の測定精度を調査した上で、構築した計測系を用いて励起レーザ光照射中の血液試料の透過吸収スペクトルを測定し、各種ヘモグロビン濃度変化を求める。

6.2 透過吸収スペクトルが測定可能な血液試料のヘマトクリット値選定

提案計測法ではヘモグロビンの酸化および酸素脱着に伴い変化する吸収スペクトルに着目し、血液試料の透過吸収スペクトル測定を行う。赤血球は散乱および吸収が大きい試料であるため、標準ヘマトクリット値である約40%に合わせた赤血球混濁液試料では十分な透過光を得ることが困難である[1]。本6.2部では、提案計測法における血液試料の透過吸収スペクトル測定に適したヘマトクリット値を選定することを目的とし、血液試料のヘマトクリット値を変化させたときの透過吸収スペクトルを測定した。

6.2.1 実験方法

0.9%生理食塩水（大塚生食，大塚製薬工場，徳島）にタラポルフィンナトリウム（Meiji Seika ファルマ，東京）を30 µg/mLより約10%高濃度となるように溶解させた。タラポルフィンナトリウム溶液の濃度は、微量分光光度計（Colibri Microvolume Spectrometer, フナコシ，東京）を用いて波長653 nmにおける吸光度（光路長1 mm）から求めた。波長653 nmは生理食塩水を溶媒とするタラポルフィンナトリウム溶液のQ帯吸収ピーク波長である（図6-1 参照）。生理食塩水を溶媒としたときの薬剤濃度と吸光度の関係を測定したところ、式(6.1)の検量線を得た。この検量線の決定係数 R^2 は1.00であった。

$$y = 2.84 \times 10^{-1}x + 6.32 \times 10^{-2} \quad (6.1)$$

ここで、 y は吸光度、 x は濃度[µg/mL]を示す。この検量線を用いて、調整したタラポルフィンナトリウム溶液の濃度を吸光度より算出した。

兔脱繊維血（0106-1，日本バイオテスト研究所，東京）を遠沈管に10 mL入れ、遠心分離機（5.4.1節と同じ）を用いて4°Cの環境下において回転数3500 rpm (1917×g)で10 min 遠心分離を行った。安定した光学計測を行うために、励起レーザ光照射中に赤血球凝集が生じないよう、赤血球凝固因子であるフィブリノゲンを完全に除去した脱繊維血を選定した。ピ

(i) , (ii)

(i) 10 mL 0.9%

(ii) (4 \times , 3500 rpm, 10 min)

0.9% 40

40

0.625-10%

30 μ g/mL

40 mg/m²

27 μ g/mL [2]

10

1 mm (KN3316550, ,) 150 μ l

(6-2 (a)) 6-2 (b)

120 mW/cm² 40 J/cm² 333 s 5.3.1

663 nm

475-600 nm

(UV3600, ,) 1

nm (11 mm,

4.5 mm)

5% 0.625

6.2.2 Φ

Φ

6-3 6-4 541 nm 577 nm

5% 0.625%

IAD [3] 663 nm $1/\epsilon_{\text{eff}}$

1.7 mm 5.5 mm 475-600 nm

6-5

2.5

Φ

10

[1]

5%以下において吸光度測定波長 475-600 nm における変動係数の平均値は 9.0×10^{-2} 未満に収まった。ヘマトクリット値 0.645% 以下のとき、濃度 30 $\mu\text{g/mL}$ のタラポルフィンナトリウム分子数がヘモグロビンの分子数を上回る [2, 4, 5]。加えて、ヘマトクリット 0.625% の血液試料における励起レーザ光の中心波長である 663 nm での光侵入長は実測結果より 5.5 mm であり、これは光学ガラスセルにおける励起レーザ光の光路長 10 mm の半分以上を占める。以上より、以降の提案計測法の実験における血液試料のヘマトクリット値を 0.625% とした。

6.3 血液試料における各種ヘモグロビン濃度の光増感反応条件依存性

本 6.3 部では、6.2 部で確認された励起レーザ光照射前後における吸収スペクトルの形状変化が光増感反応により生じたものかを検討するため、光感受性薬剤濃度と放射照射量を変化させたときの吸収スペクトル変化および実測した吸収スペクトルから各種ヘモグロビン濃度を解析する方法を検討した。

6.3.1 実験方法

6.3.1.1 光増感反応による血液試料の吸収スペクトル変化

6.2.1 節と同様の手順においてブタ赤血球 (芝浦臓器, 東京) を用いてヘマトクリット 0.625%、タラポルフィンナトリウム濃度 1, 5, 30 $\mu\text{g/mL}$ の血液試料を作製した。作製した血液試料に対し、6.2.1 節と同様の光照射系を用いて放射照射量を次のように変化させた。タラポルフィンナトリウム濃度が 1, 5 $\mu\text{g/mL}$ の血液試料は 20 J/cm^2 、タラポルフィンナトリウム濃度が 30 $\mu\text{g/mL}$ の血液試料は 2.5-20 J/cm^2 とした。ヘマトクリット 0.625% に該当する赤血球数を蒸留水に溶解させ完全溶血を起こした溶血試料を作成した。光照射後の血液試料および溶血試料に対し、6.2.1 節と同様の条件で吸光度を測定した。

6.3.1.2 実測吸収スペクトルに対する重回帰分析

血液試料の実測吸収スペクトルから各種ヘモグロビン濃度を解析することを目的として、重回帰分析を行った。重回帰分析とは複数の独立変数から 1 つの量的変数を予測および説明する解析法である [6]。本実験では式 (6.2) のような重回帰モデル式を定義した。

$$\hat{y}_{\lambda_i} = b_0 + b_1 x_{1\lambda_i} + b_2 x_{2\lambda_i} + b_3 x_{3\lambda_i} + b_4 x_{4\lambda_i} \quad (6.2)$$

ここで、式 (6.2) に含まれる各変数の説明を表 6.1 にまとめた。このとき、赤血球混濁液試料の実測値 y_{λ_i} と従属変数 \hat{y}_{λ_i} の残差平方和 $\sum (y_{\lambda_i} - \hat{y}_{\lambda_i})^2$ が最小となるような回帰係数を求めた。これは最小二乗法と呼ばれている [6-8]。波長領域 475-600 nm において波長間隔 1 nm で測定を行ったため、 λ_i は 126 点のデータ数を用いた。重回帰分析は数値解析ソフトウェアである MATLAB® (R2018a (9.4.0.813654), MathWorks, マサチューセツ, アメリカ) の lsqin 関数を用いて行った [9]。重回帰分析は各時刻における実測吸収スペクトルに対してそれぞれ行

6.3.2 Φ

Φ

6-6

6-7

541 nm 577 nm
500 nm

6.3.1.2

6-8

6-9

R 0.99

6-8

0.20±0.01 g/dL
g/dL

6-9

0.21±0.01

0.625%

0.19 g/dL

10%

(i)

(ii)

Q

Q

[10,

11]

6-10

Q

600-700 nm

Q

6-11

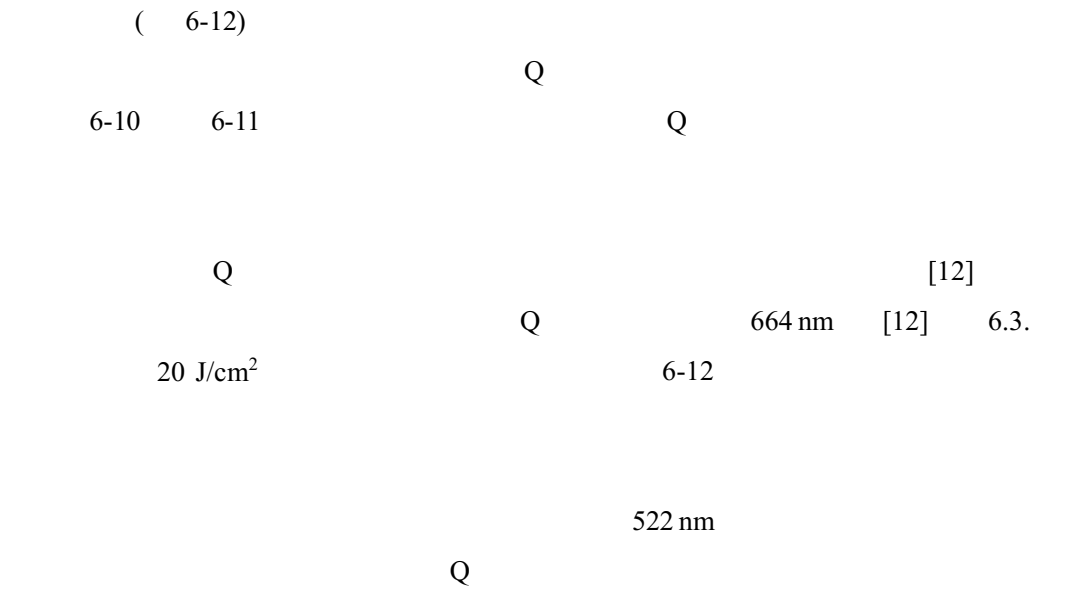
Q

Q

Q

Q

Q



6.4 Φ
Φ 6.3

6.4

6.4.1 Φ
Φ Φ

6-13

6-14

6-15

5.3.1

663 nm

6-16

15 mm路

10 mm

(RX-3300,

,)

Q

653 nm

470-650 nm

励起レーザ光のみが光増感反応に寄与するようにした。フィルターは 470 nm ハイパスカットフィルター (LVX470, 朝日分光, 東京) [13] と 650 nm ローパスフィルター (SVX650, 朝日分光, 東京) [14] を用いた。これらのフィルターを介した吸収スペクトル測定光の透過光スペクトルを図 6-17 に示す。吸収スペクトル測定光のビーム径は 7 mm Φ であり、自作の直径 4 mm Φ アパーチャを通して血液試料に照射した。血液試料の吸収・散乱が大きいことを考慮し、測定光に対する血液試料の光路長を 1 mm とし、測定箇所は励起レーザ光の出射側となるよう配置した (図 6-14)。また、血液試料に対する吸収スペクトル測定光の透過光は積分球を介して高速マルチチャンネル分光器 (C10027-02, 浜松ホトニクス, 静岡) に受光するよう配置し、試料散乱の影響を抑制した (図 6-13)。ここで励起レーザ光が散乱体である血液試料に当たり積分球内に迷光する影響を考慮し、分光器の受光センサの前に 655-665 nm ノッチフィルタを配置した。このとき、分光器の測定波長領域は 195-958 nm であり、タラポルフィンナトリウムの蛍光波長である 670 nm 付近の分光器検出カウント数も同時かつ連続的に測定可能である。

6.4.2 吸収スペクトル測定系の精度検討

6.4.1 節で構築した実験系の吸光度測定精度を把握することを目的に、連続的な吸光度測定に影響を及ぼすと考えられる、(i) 吸収スペクトル測定光の照射時間に伴う光強度のばらつき、(ii) 時間経過に伴う血液試料の赤血球沈殿、の影響に関して検討する。

6.2.1 節に記載した手順において兔脱繊維血を用いてタラポルフィンナトリウムを含まないヘマトクリット 0.625% の赤血球混濁液試料を作製した。光学ガラスセルに生理食塩水を入れた試料を光学測定の参照試料とした。これらの試料に、6.4.1 節で構築した実験系を用いて吸収スペクトル測定光照射中における波長 475-600 nm の透過光を図 6-13 内の分光器で測定した。透過光スペクトルは波長間隔 0.75 nm にて 1 s 間隔、333 回連続的に測定した。このとき、励起レーザ光は照射していない。測定開始からの時刻 t における波長 λ_A の赤血球混濁液試料の吸光度 $A(\lambda_{At})$ を以下の式 (6.3) により算出した。

$$A(\lambda_{At}) = -\log_{10} \left(\frac{I_{\lambda_{At}}}{I_{0\lambda_A}} \right) \quad (6.3)$$

ここで $I_{\lambda_{At}}$ は赤血球混濁液試料の時刻 t 、波長 λ_{At} における分光器検出カウント数を示し、 $I_{0\lambda_A}$ は参照試料の波長 λ_A における分光器検出カウント数の照射時間 333 s における平均値を示す。 λ_A は波長域 475-600 nm、波長間隔 0.75 nm をとる。

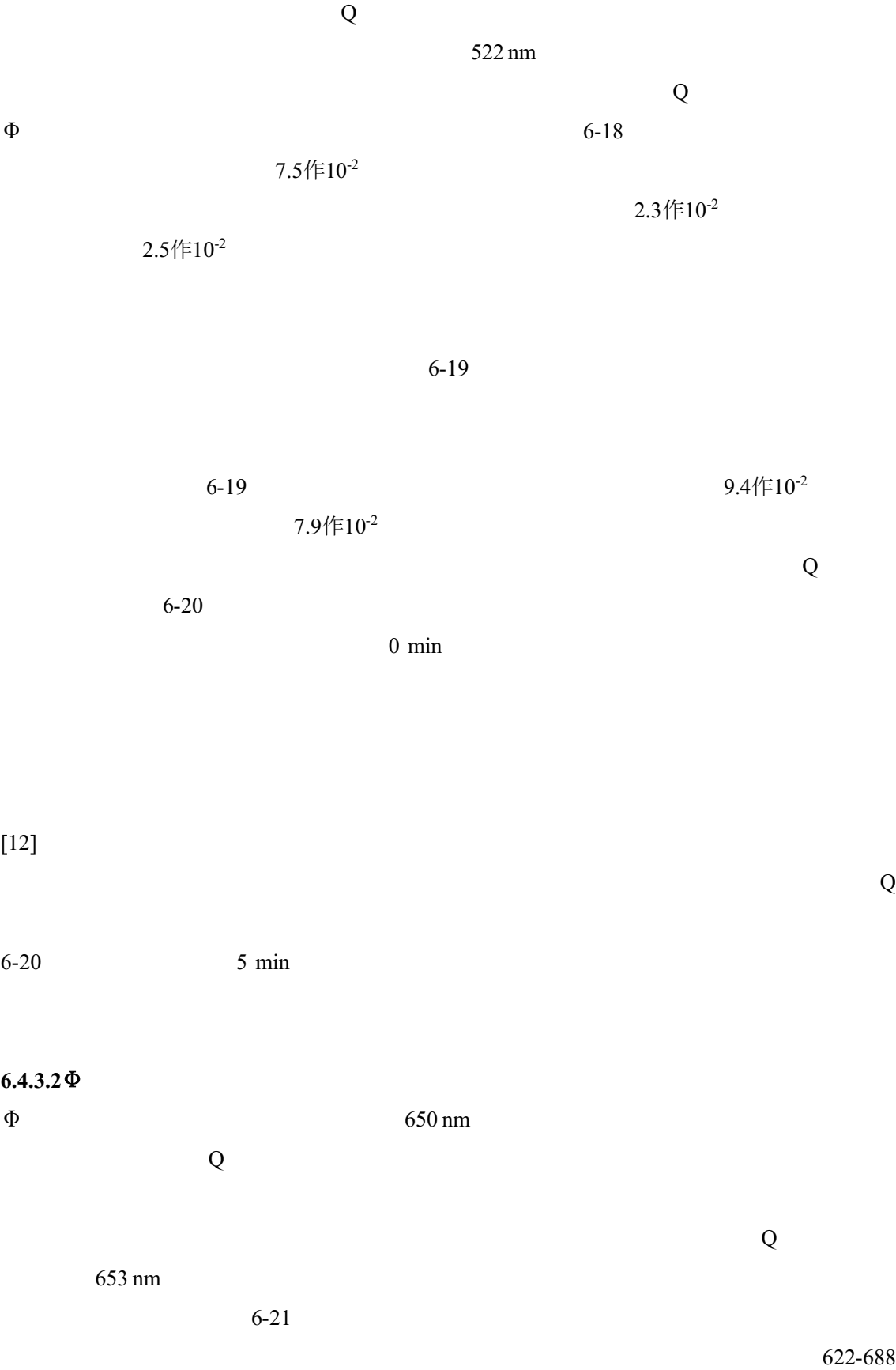
(i) 吸収スペクトル測定光の各波長における照射時間に伴う参照試料の分光器検出カウント数の変動係数を求めたところ、最大でも波長 559 nm において 4.0×10^{-3} であった。赤血球混濁液に対する連続的な吸光度測定において、照射時間に伴う吸光度の標準偏差は最大でも波長 479 nm において 8.6×10^{-3} であり、変動係数は 2.5×10^{-2} であった。赤血球混濁液の吸収スペクトル測定における変動係数 2.5×10^{-2} のうち、上述の参照試料に対する偏差の幅を

6.0作10⁻³
(ii) 333 s 2.5
作10⁻² 10 s
2.7作10⁻²

6.4.3Φ
6.4.3.1Φ

[15]

Φ 6.2.1 0.625
30 μg/mL
5-120 min 475-600 nm
6.4.1 6.4.2
6.3.1.2
475-600 nm 0.75 nm i 165
Φ 6.2.1 20
30 μg/mL
5-120 min 5 min (5.4.1
) 4 3500 rpm (1917g) 5 min
80 μL 80 μL
150 μL 15 1700 rpm (931g) 5
min 6.2.1
1 nm 2.1 mg/mL
5 min
Q



nm での各波長における積算値を加算した総和値を比較したところ、タラポルフィンナトリウムの吸収スペクトルに対する吸収スペクトル測定光の総和値は励起レーザ光照射の総和値に対し 2.5% 程度であり、十分小さいと考えられる。

6.5 光増感反応中の各種ヘモグロビン濃度動態

6.4.1 部で構築した実験系を用いて、血液試料に対し励起レーザ光を照射すると共に血液試料の吸収スペクトル測定を同時かつ経時的に行い、励起レーザ光照射中の血液試料の各種ヘモグロビン濃度変化を調査する。

6.5.1 実験方法

6.2.1 節に記載した手順において兔脱繊維血を用いてヘマトクリット値 0.625%、タラポルフィンナトリウム 30 $\mu\text{g/mL}$ の血液試料を作製した。この血液試料に対し、6.4 部で構築した実験系を用いて励起レーザ光を放射照度 60 mW/cm^2 で 20 J/cm^2 となるまで 333 s 照射を行った。透過光量は高速マルチチャネル分光器により露光時間 19 ms、波長間隔 0.75 nm、時間間隔 1 s で測定した。吸光度は 6.4.2 節の方法で式 (6.2) を用いて算出した。6.4.2 節と同様にしてタラポルフィンナトリウムを含まない血液試料の吸収スペクトルを計測した。

実測した吸収スペクトルに対し 6.3.1.2 項と同様の重回帰分析を行い、各種ヘモグロビン濃度を算出した。さらに、算出した酸素化ヘモグロビン濃度と脱酸素化ヘモグロビン濃度から式 (6.4) を用いて酸素飽和度を算出した。

$$SaO_2 = \frac{C_{HbO_2}}{C_{HbO_2} + C_{HHb}} \times 100 \quad (6.4)$$

ここで、 SaO_2 は酸素飽和度、 C_{HbO_2} は酸素化ヘモグロビン濃度、 C_{HHb} は脱酸素化ヘモグロビン濃度を指す。

6.5.2 実験結果および考察

構築した実験系により励起レーザ光照射中における血液試料の透過吸収スペクトルを測定した結果を図 6-22 に示す。光照射に伴い 541 nm と 577 nm 付近に 2 つのピークを持つ酸素化ヘモグロビン由来のスペクトルが徐々になくなり、500 nm 付近に単一ピークを持つメトヘモグロビン由来の吸収スペクトルが出現した。このスペクトル変化は、6.3 部において紫外可視近赤外分光光度計を用いた際の放射照射量増加に伴う吸収スペクトル変化と同じ傾向である。このことより、構築した実験系において血液試料の透過吸収スペクトルを測定できていることが示唆された。構築した実験系による測定では、光照射時間に伴い吸収スペクトル全体が下降していた。これは、励起レーザ光照射時間、すなわち光増感反応進行に伴い血液試料が赤血球混濁液から赤血球膜破裂によりヘモグロビン溶液へ変化し、血液試料の散乱が小さくなったためと考えられる。励起レーザ光照射に伴う吸収スペクトル測定領

8.3

6-23

0.99

0.28±0.02 g/dL

200 s

200 s 0

(6-24)

Φ 6-23

0.625%

0.21±0.02 g/dL [16]

in vitro

() 6.3

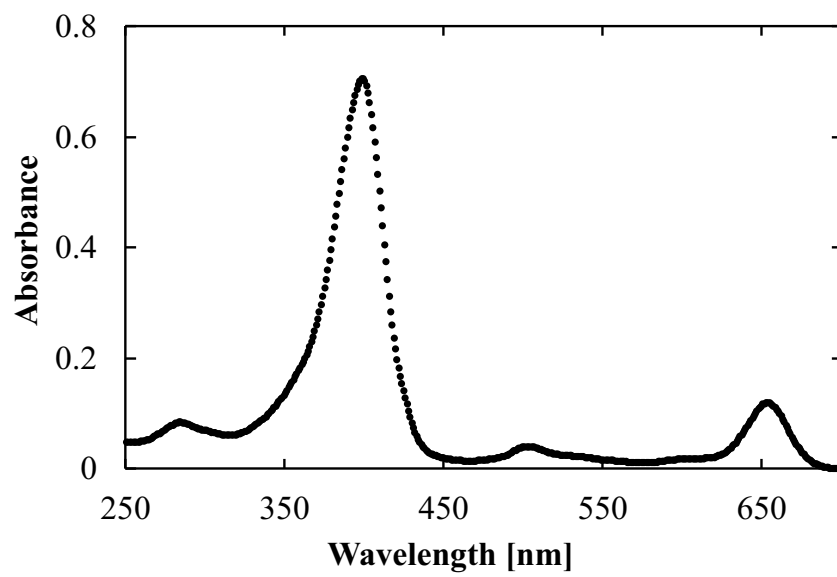
6.5.1

3 min

6.6 Φ
Φ

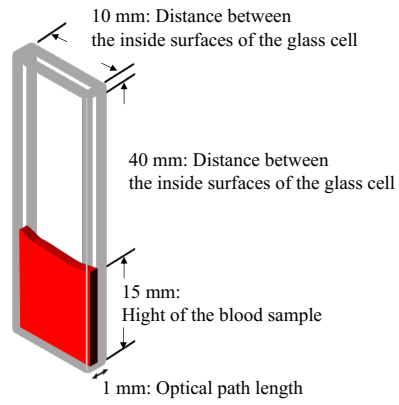
- [1] A. Roggan, M. Friebel, K. Korschel, A. Hahn, and G. Muller, "Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400-2500 nm." *J. Biomed. Opt.*, vol. 4, pp. 36-47, 1999.
- [2] Meiji Seika, , 100 mg, , 2016 6 (10).
- [3] W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch, "A review of the optical properties of biological tissues," *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. 26, pp. 2166-2185, 1990.
- [4] J. D. Spikes and C. B. Jerry, "Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors," *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 17, pp. 135-143, 1993.
- [5] , , : , 2006, pp. 4-106.
- [6] , *R* , : , 2011, pp. 93-152.
- [7] , , , : , 2014, pp. 110-167.
- [8] B. K. Lavine, "Chemometrics," *Anal. Chem.*, vol. 72, pp. 91-98, 2000.
- [9] MATLAB ;
<https://jp.mathworks.com/help/optim/ug/lsqlin.html> (2018/11/6).
- [10] J. D. Spikes and J. C. Bommer, "Photobleaching of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors," *Photochem. Photobiol.*, vol. 58, pp. 346-350, 1993.
- [11] J. S. Dysart, G. Singh, and M. S. Patterson, "Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells," *Photochem. Photobiol.*, vol. 81, pp. 196-205, 2005.
- [12] L. Sheyhedin, K. Aizawa, M. Araake, H. Kumasaka, T. Okunaka, and H. Kato, "The effects of serum on cellular uptake and phototoxicity of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in vitro," *Photochem. Photobiol.*, vol. 68, pp. 110-114, 1998.
- [13] ; (LVX470)
<http://www.asahi-spectra.co.jp/asp/syousaik.asp?key1=LV&key2=LVX470> (2018/10/26).
- [14] ; (SVX650)
<http://www.asahi-spectra.co.jp/asp/syousaik.asp?key1=SV&key2=SVX650> (2018/10/26).
- [15] G. Scita, and P. P. Di Fiore, "The endocytic matrix," *Nature*, vol. 463, p. 464, 2010.
- [16] O. W. Schalm, N. C. Jain, E. J. Carroll, *Veterinary hematology*. (3rd edition), Philadelphia: Lea & Febiger, 1975, pp. 219-227.
- [17] P. V. A. Pamidi, M. DeAbreu, D. Kim, and S. Mansouri, "Hydroxocobalamin and cyanocobalamin interference on co-oximetry based hemoglobin measurements," *Clin. Chim.*

Acta, vol. 401, pp. 63-67, 2009.

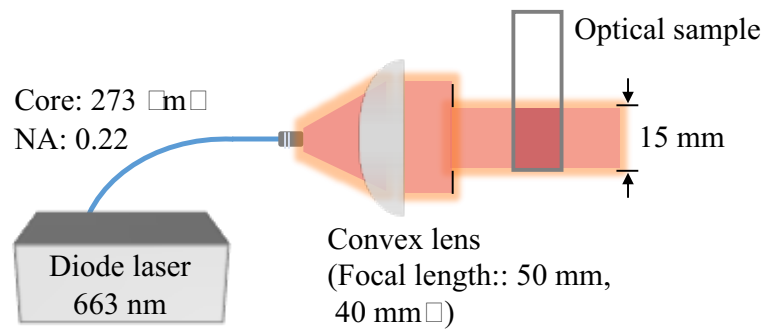


6-1 Φ
(N=1)

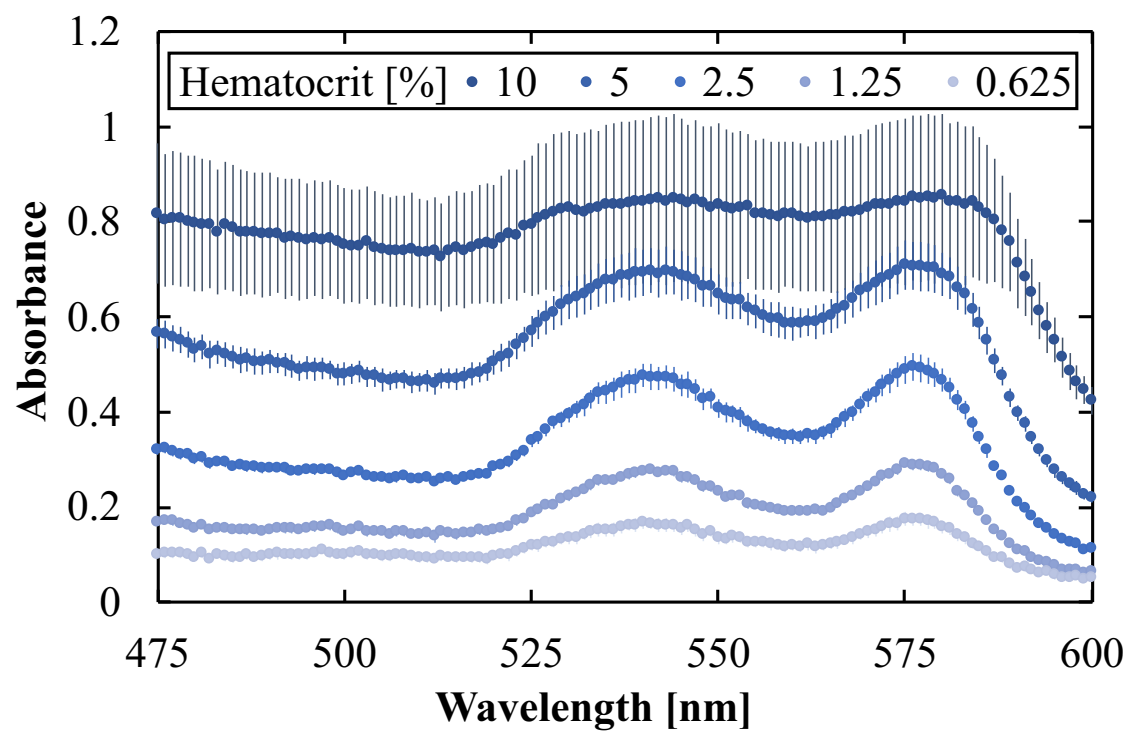
(a)



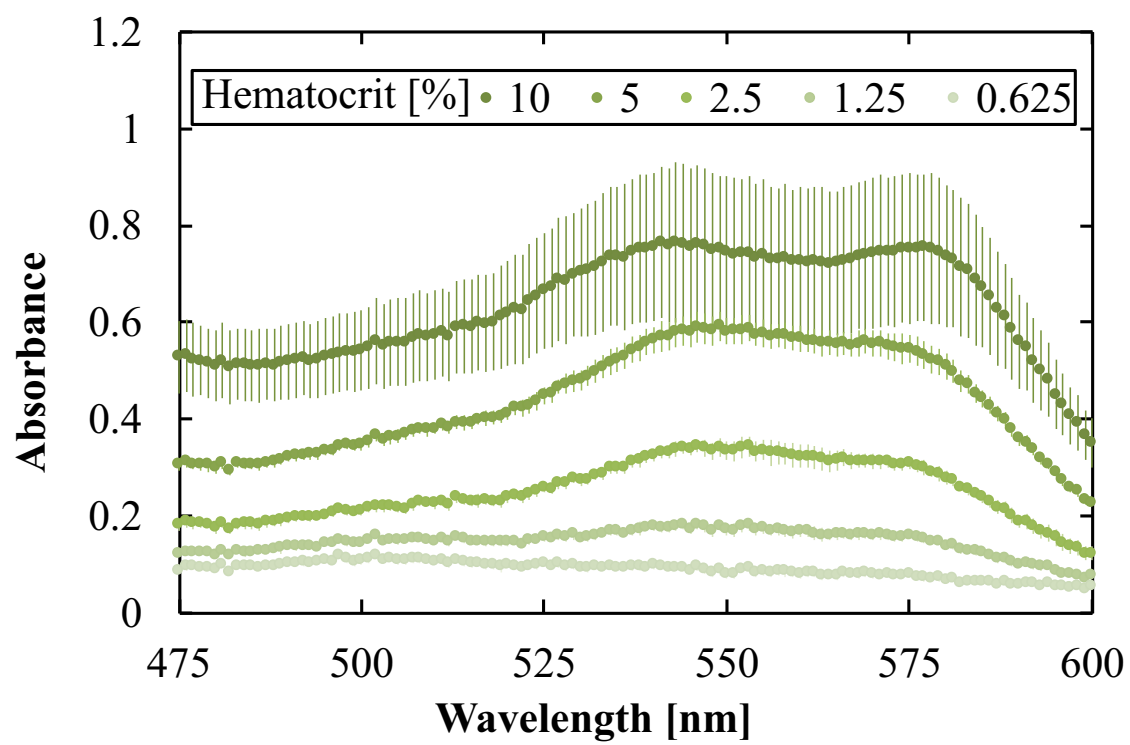
(b)

6-2 Φ (a)

(b)

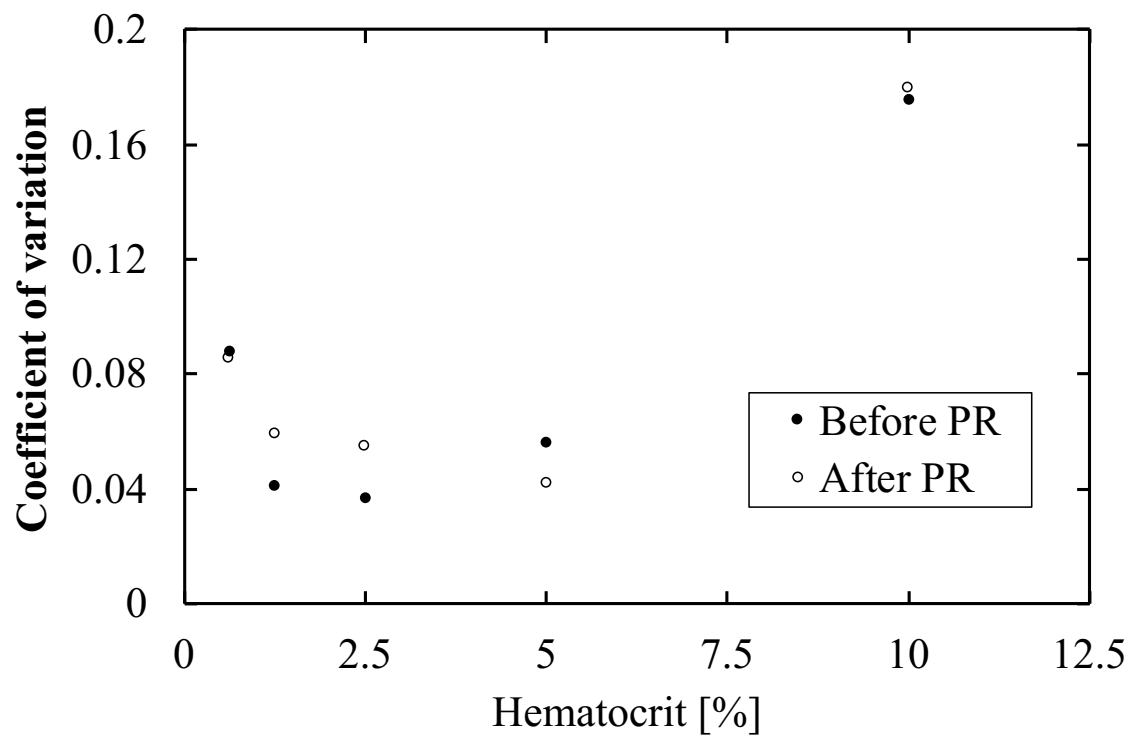
6-3 Φ

(N=5)



6-4

(N=5)

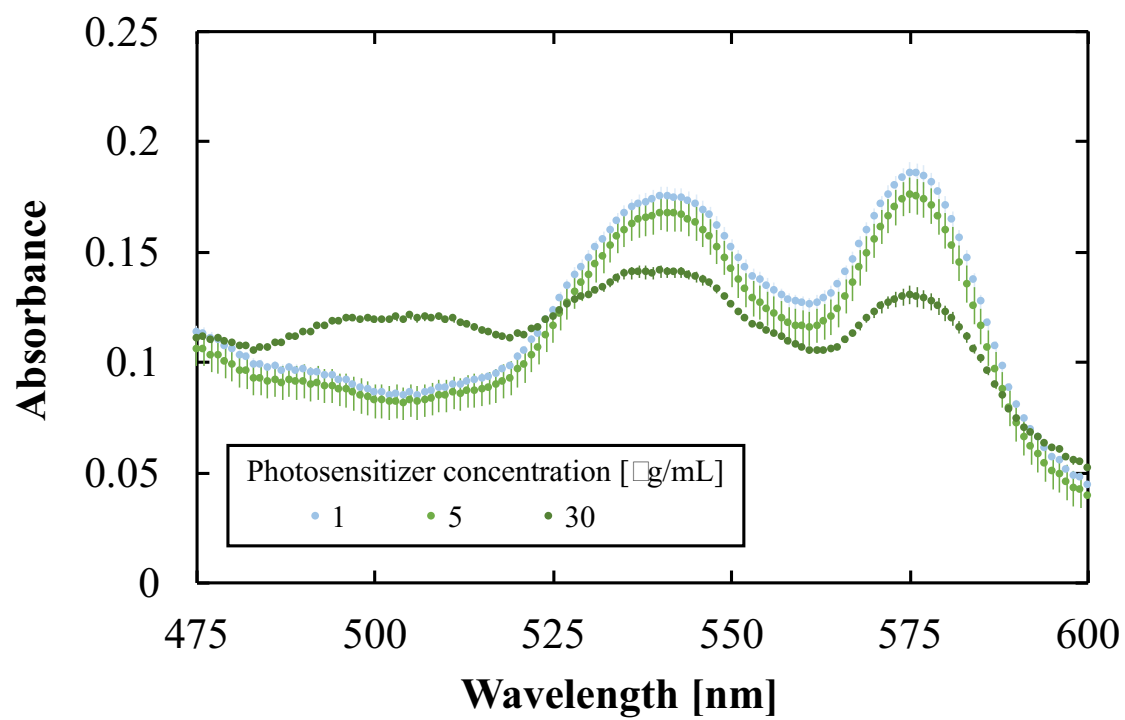


6-5 Φ

475-600 nm

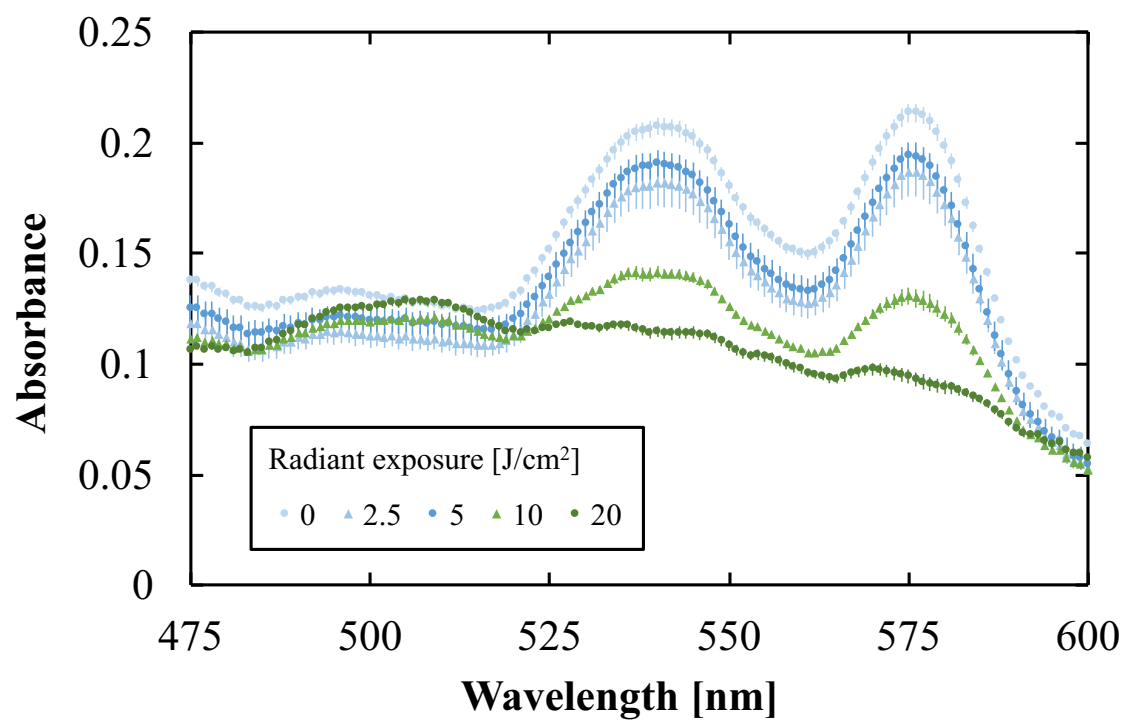
表 6.1 式 (6.2) における各変数の説明

Variable	Description	
\widehat{y}_{λ_i}	Dependent value	
$x_{1\lambda_i}$	Reported absorbance values for (at wavelength λ_i)	Oxygenated hemoglobin (15.6 g/dL) [17]
$x_{0\lambda_i}$		Deoxygenated hemoglobin (15.9 g/dL) [17]
$x_{3\lambda_i}$		Methemoglobin (15.8 g/dL) [17]
$x_{4\lambda_i}$	Measured absorbance values for 30 $\mu\text{g/mL}$ talaporfin sodium medium with saline (at wavelength λ_i)	
b_0 – b_4	Regression coefficients, which correspond to $x_{1\lambda_i}$ – $x_{4\lambda_i}$, respectively	

 $6-6\Phi$

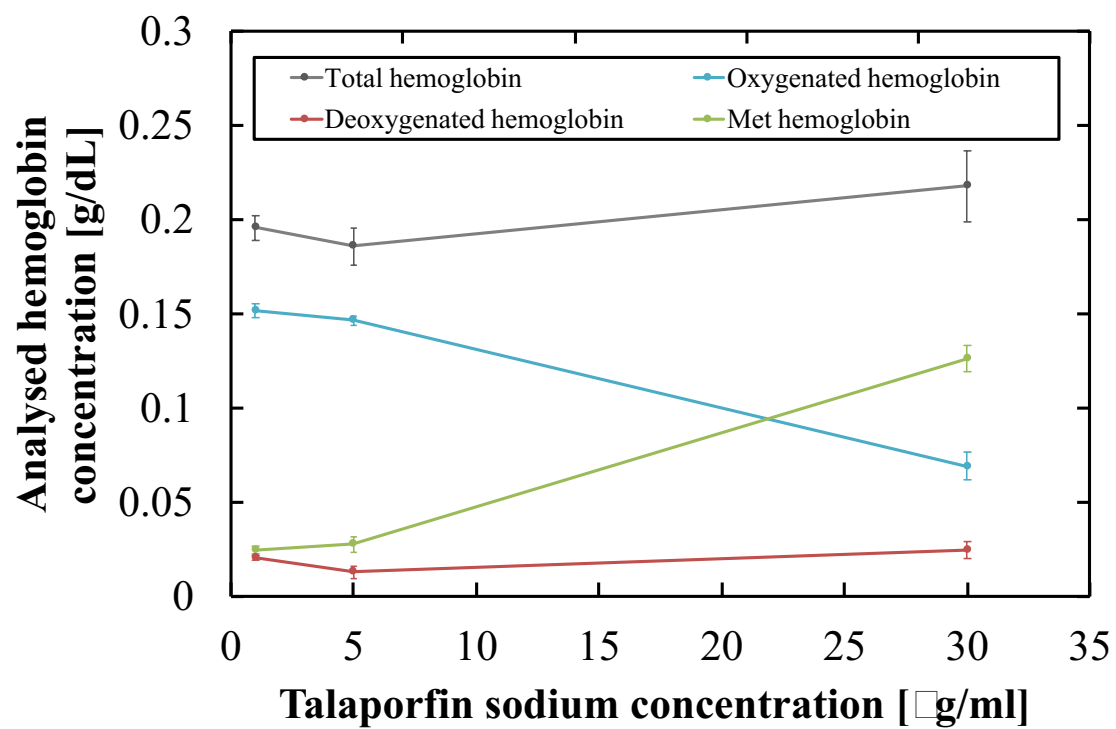
(N=4, Irradiance

120 mW/cm², Radiant exposure 40 J/cm²)



6-7Φ
mW/cm², Talaporfin sodium 30 µg/mL)

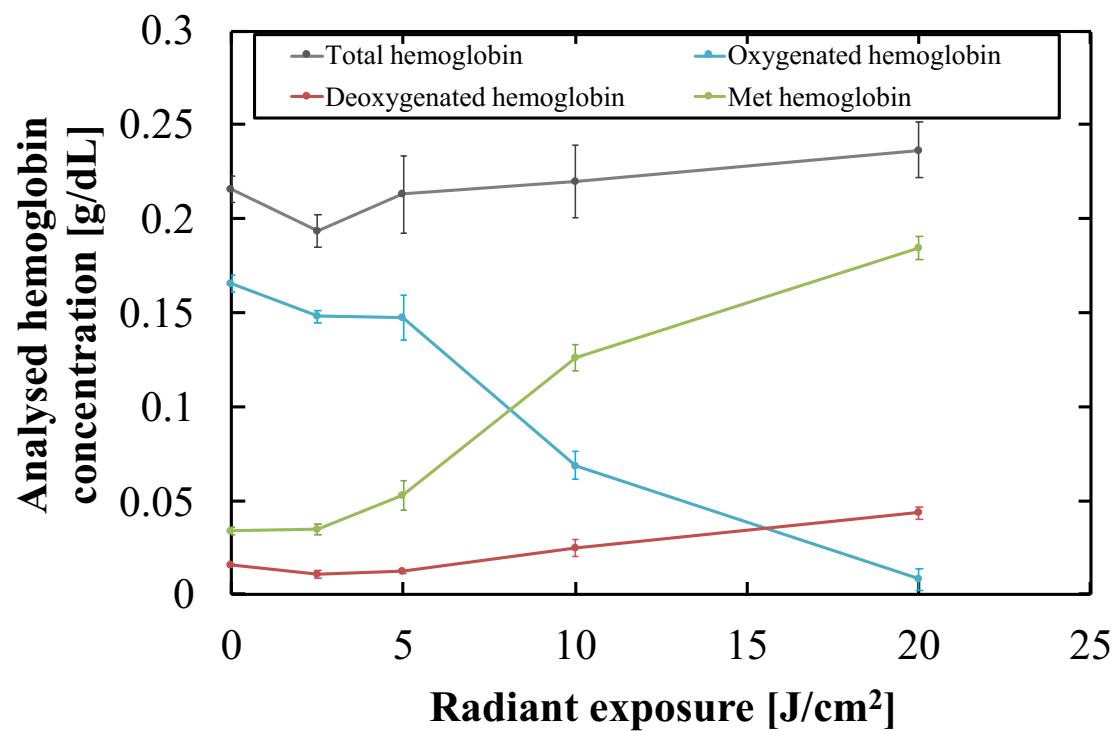
(N=4, Irradiance 120



6-8

(N=4,

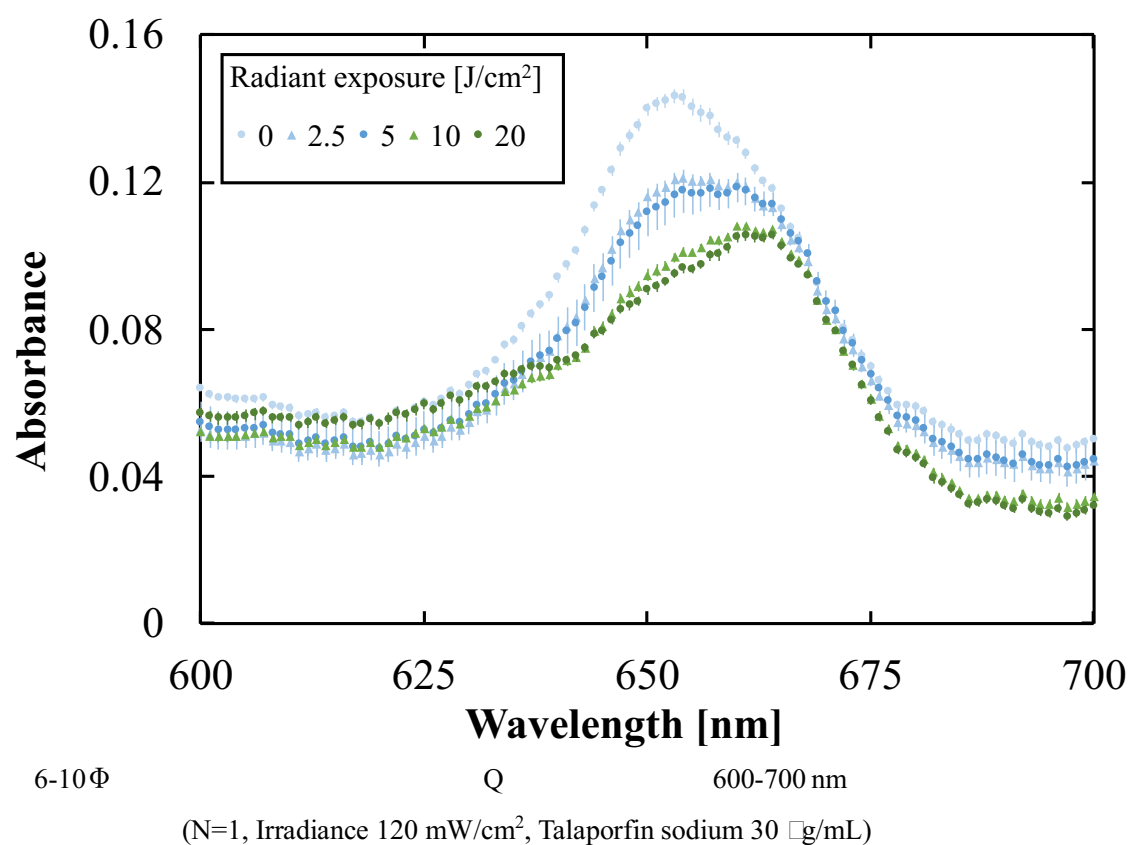
Irradiance 120 mW/cm², Radiant exposure 40 J/cm²)

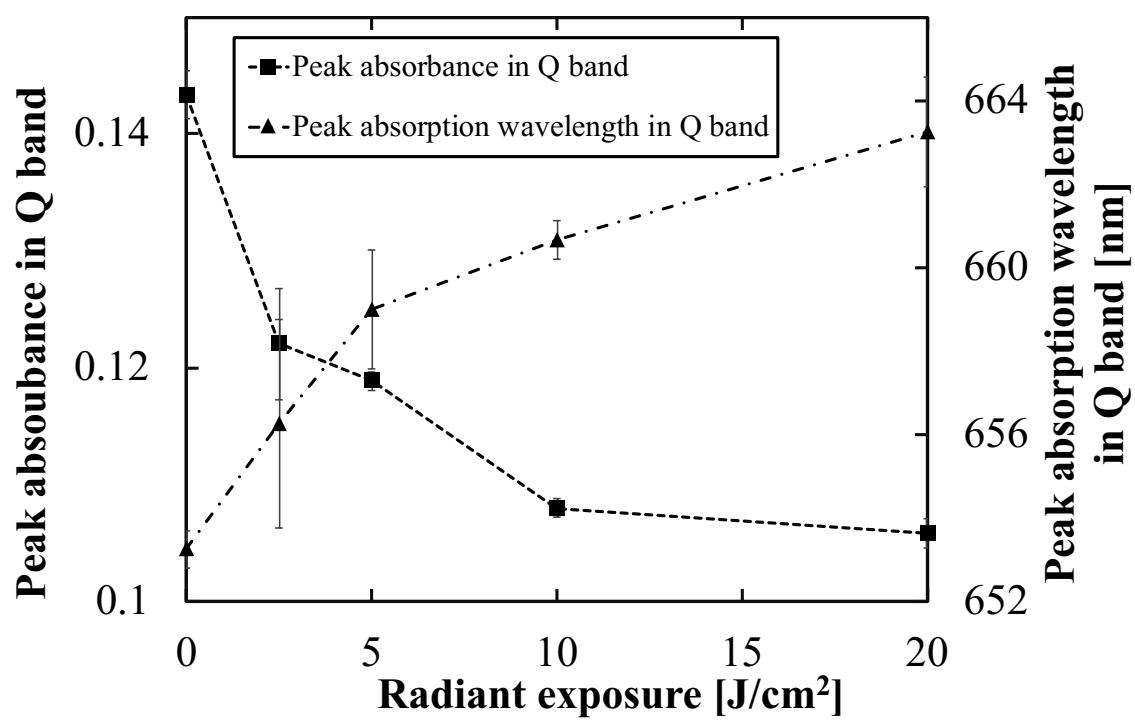


6-9Φ

(N=4, Irradiance

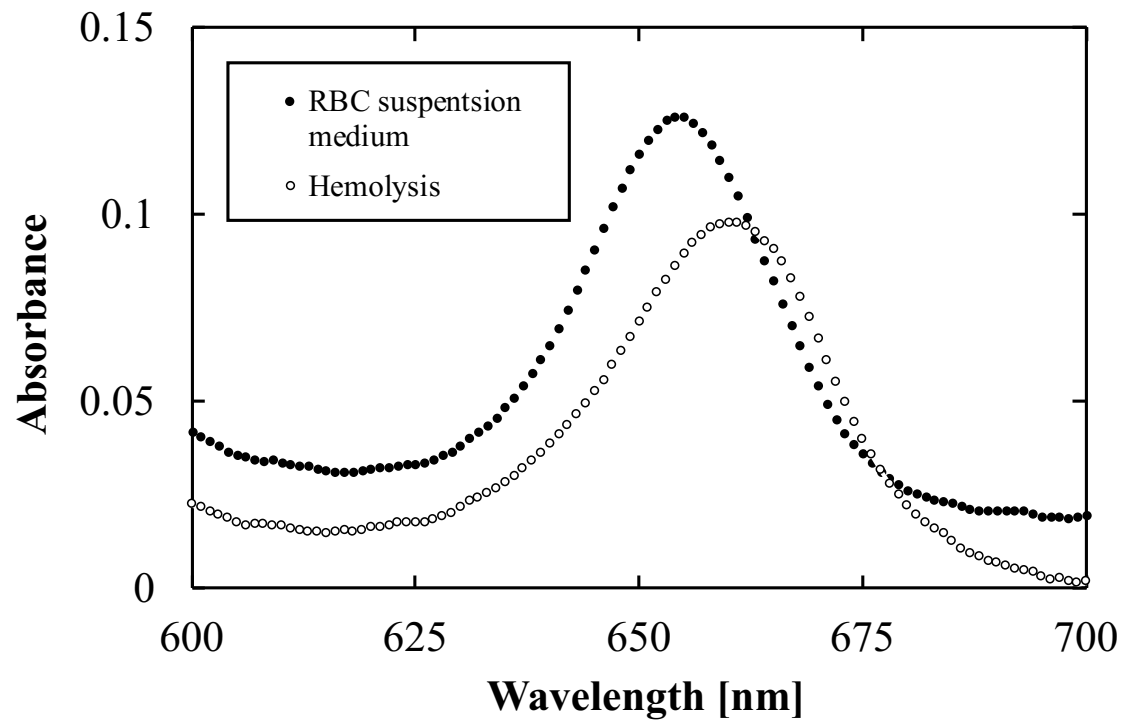
120 mW/cm², Talaporfin sodium 30 μg/mL)



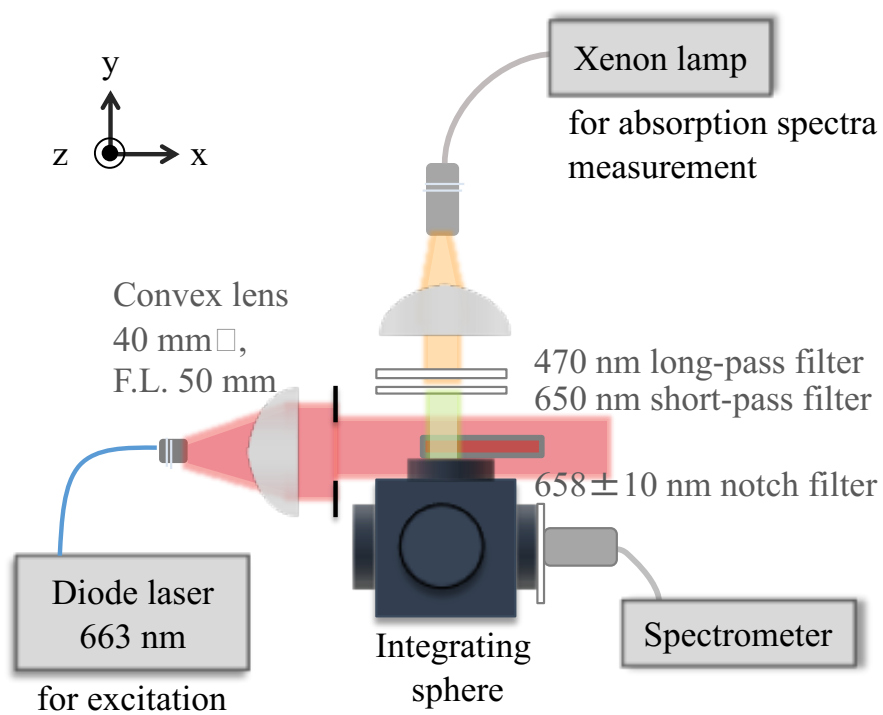
6-11 Φ

600-700 nm

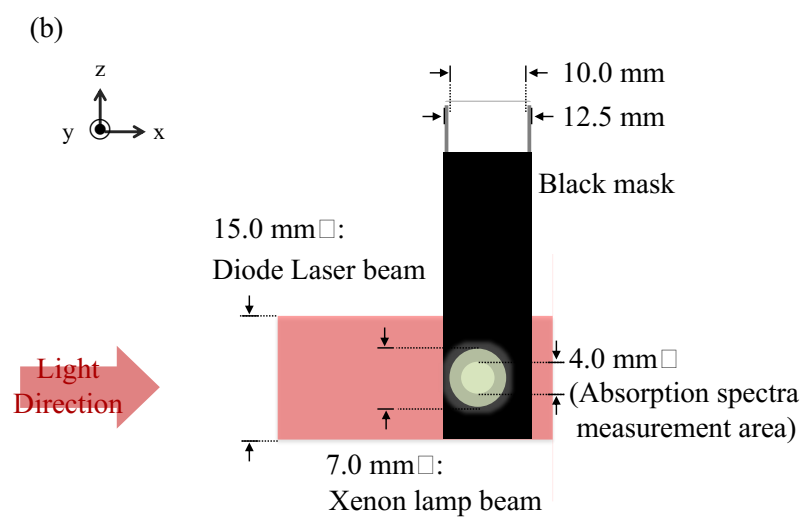
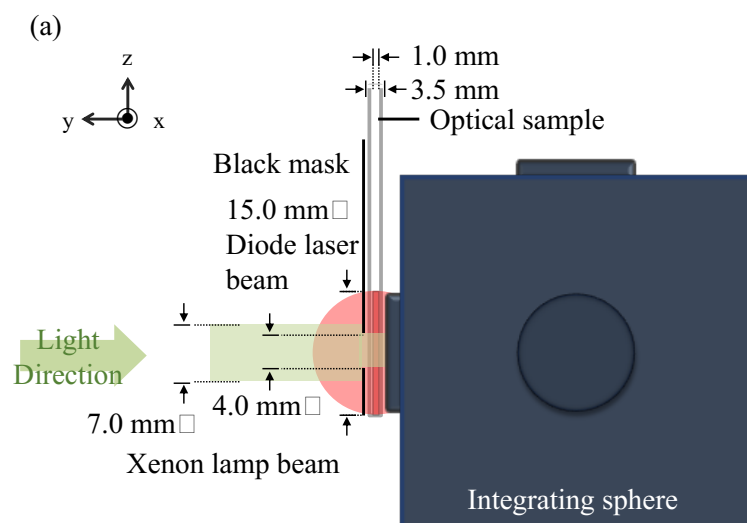
(N=4, Irradiance 120 mW/cm², Talaporfin sodium 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)



6-12 Φ
(N=1)

6-13 Φ

(

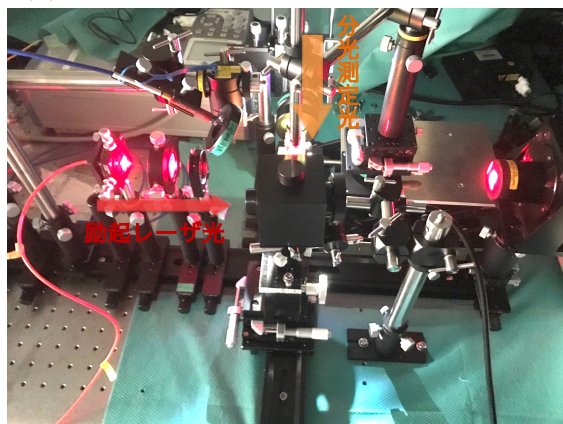


6-14 Φ

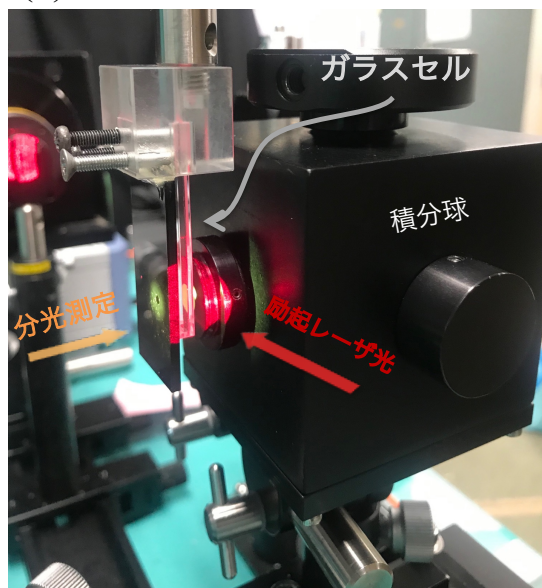
(a)

(b)

(a)



(b)

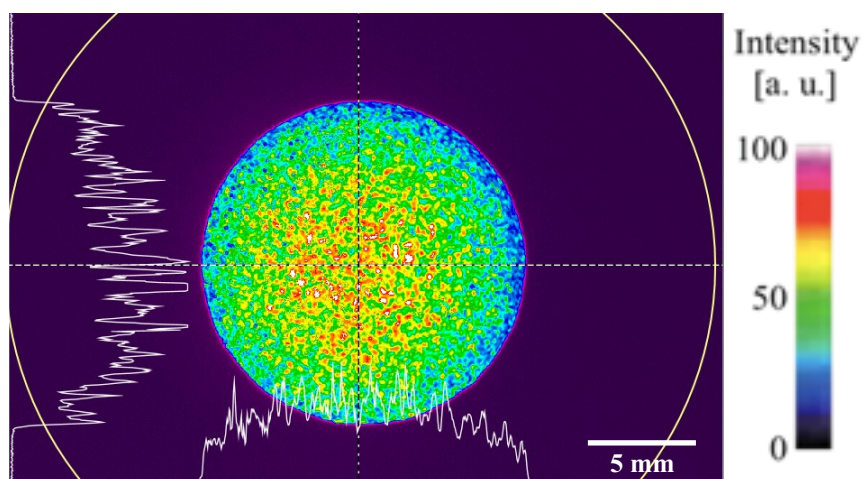


6-15Φ

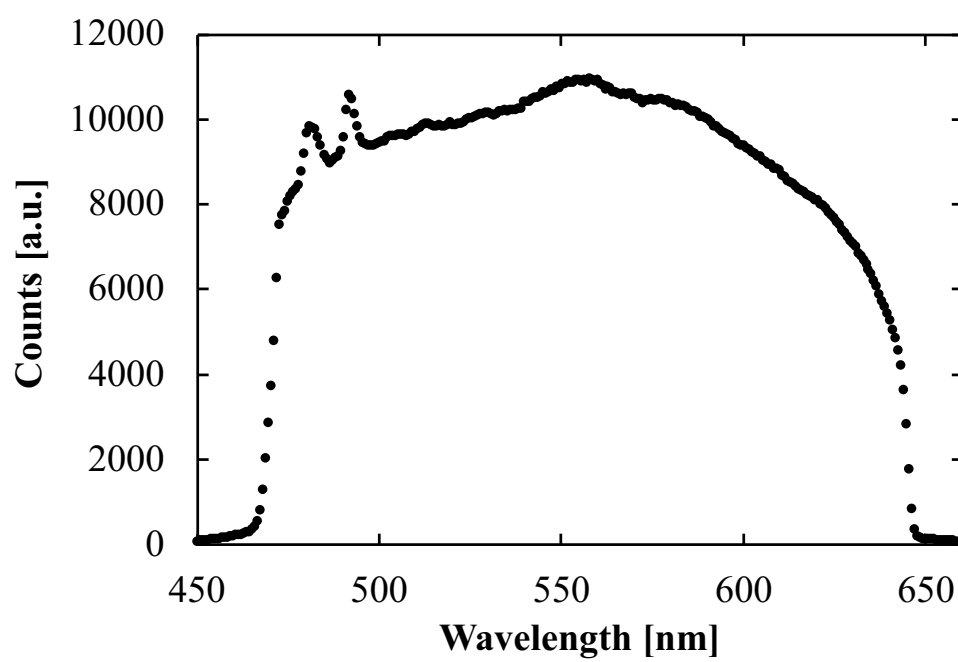
(a)

(

) (b)

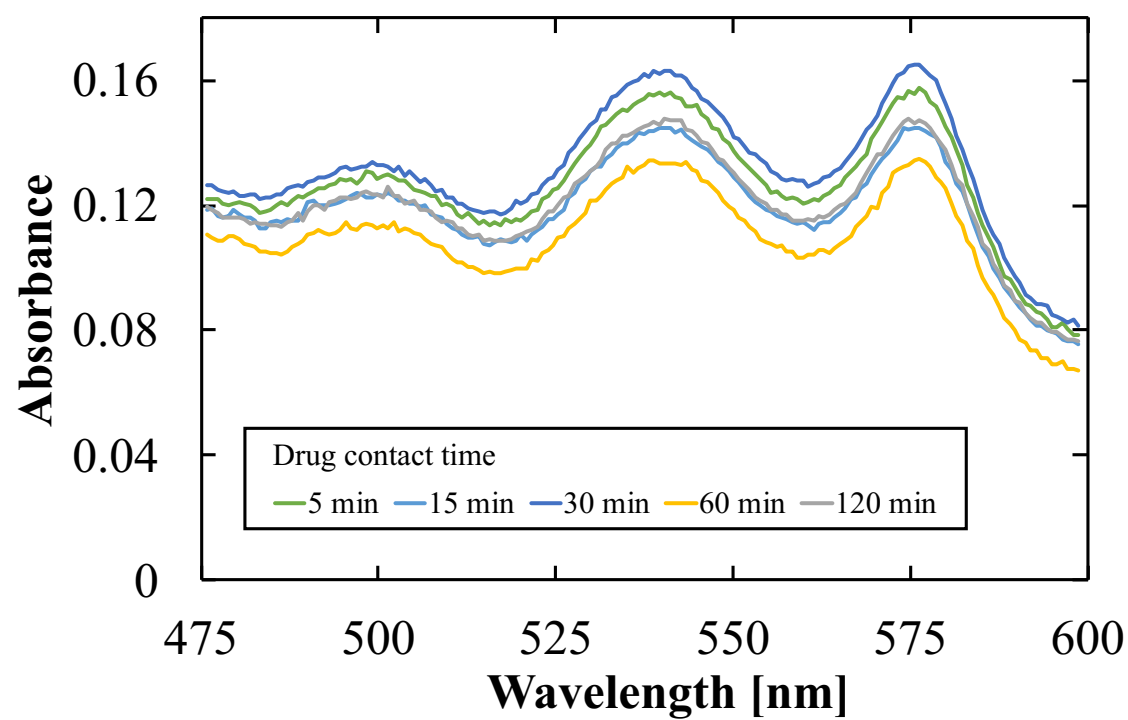
6-16 Φ

()

6-17 Φ

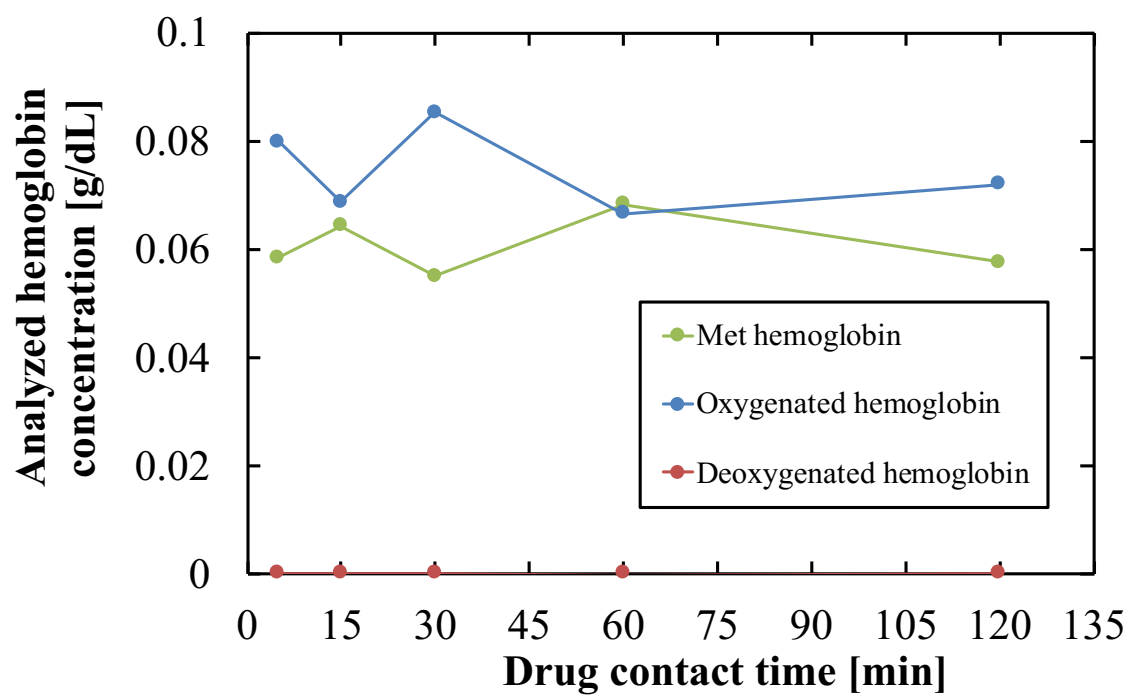
470-650 nm

(N=1)



6-18 Φ
sodium 30 μ g/mL)

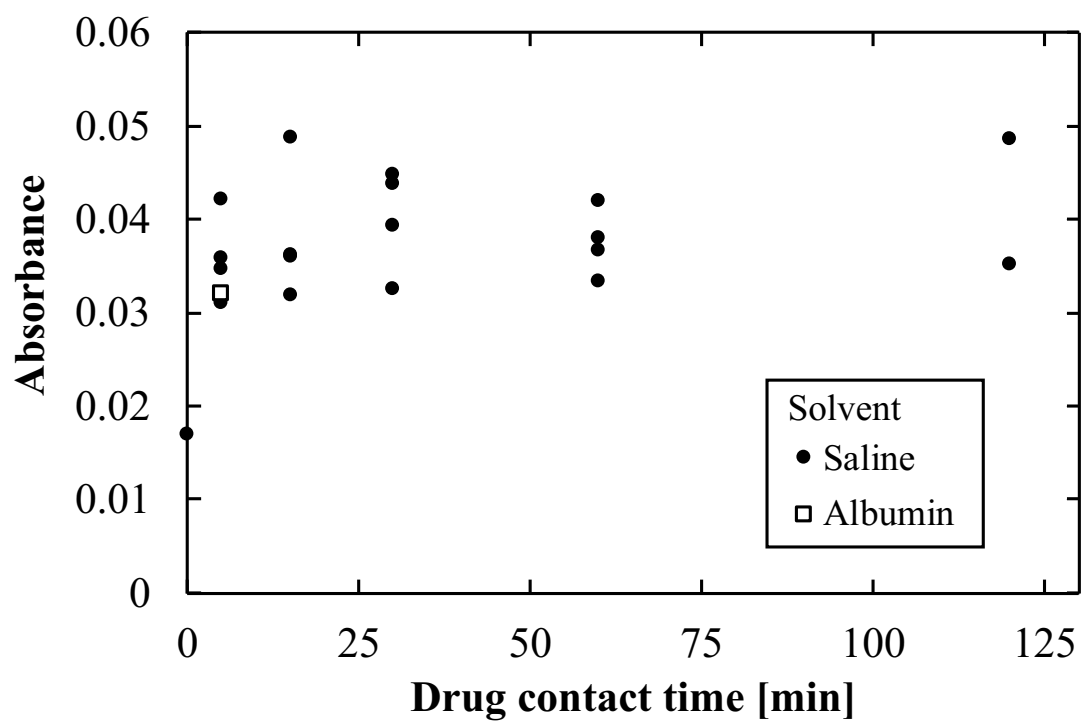
(N=1, Talaporfin



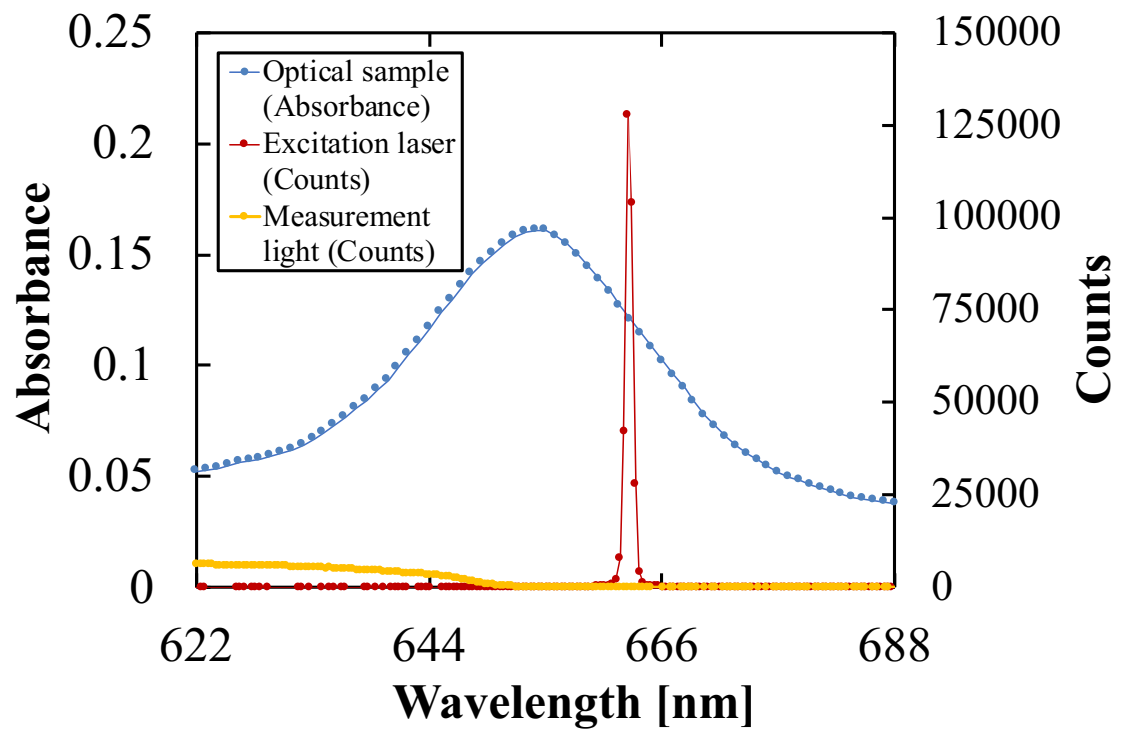
6-19 Φ

(N=1,

Talaporfin sodium 30 □g/mL)

6-20 Φ

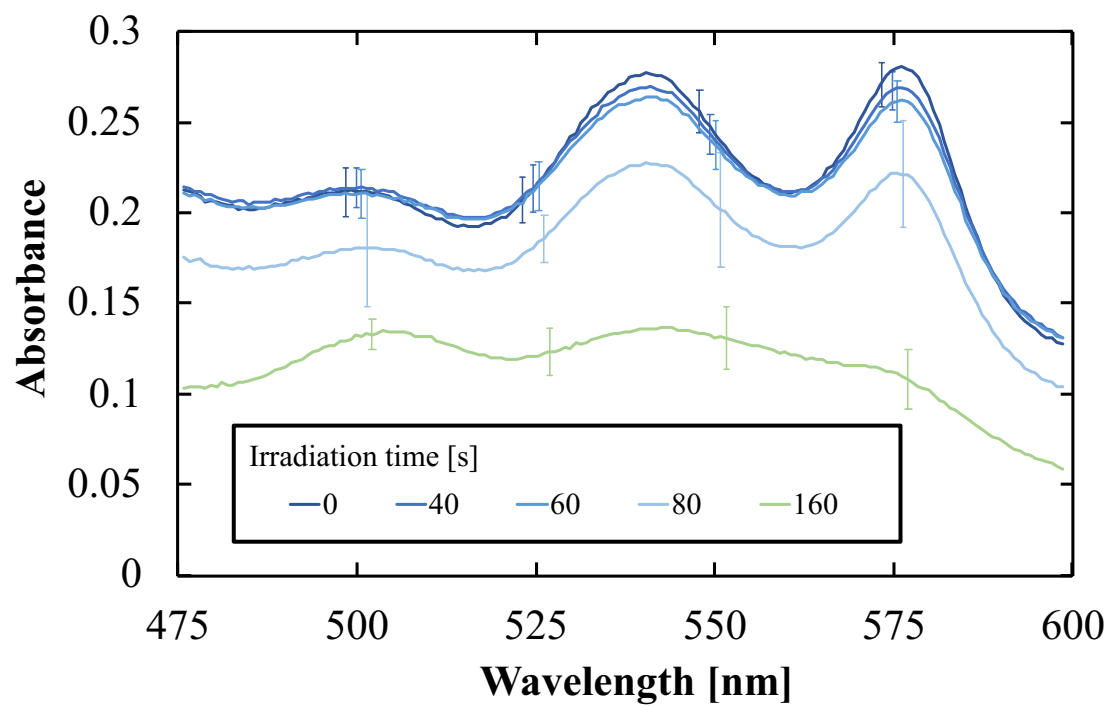
Q



6-21 Φ

Q

(N=1)



6-22 Φ

(N=5)

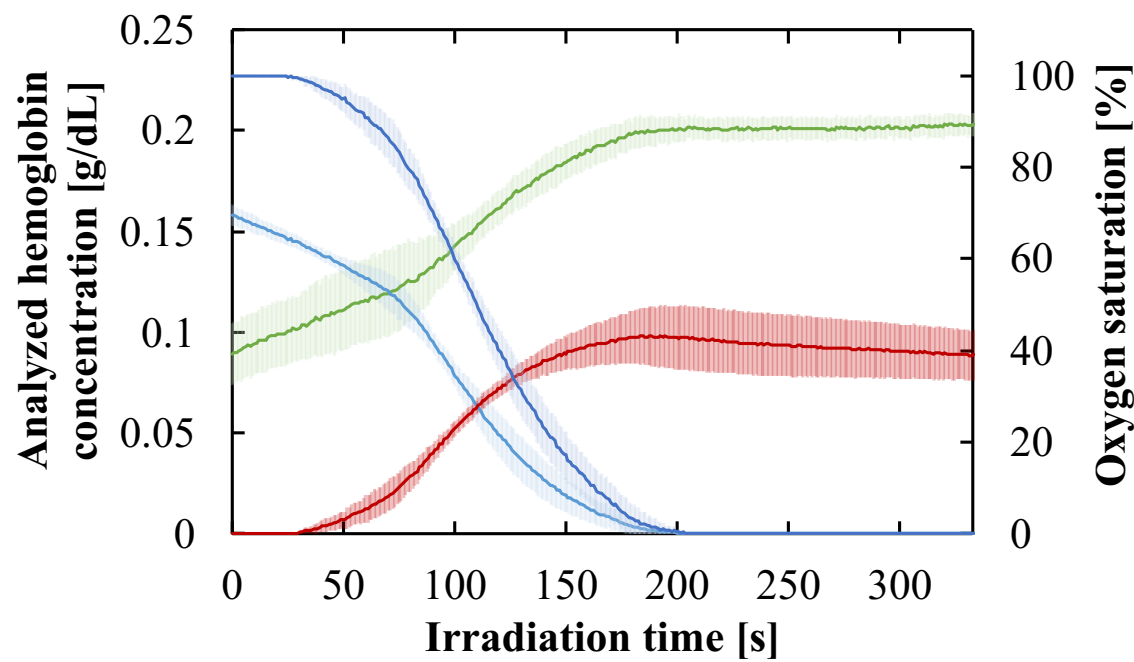
19 ms

0.75 nm

1 s

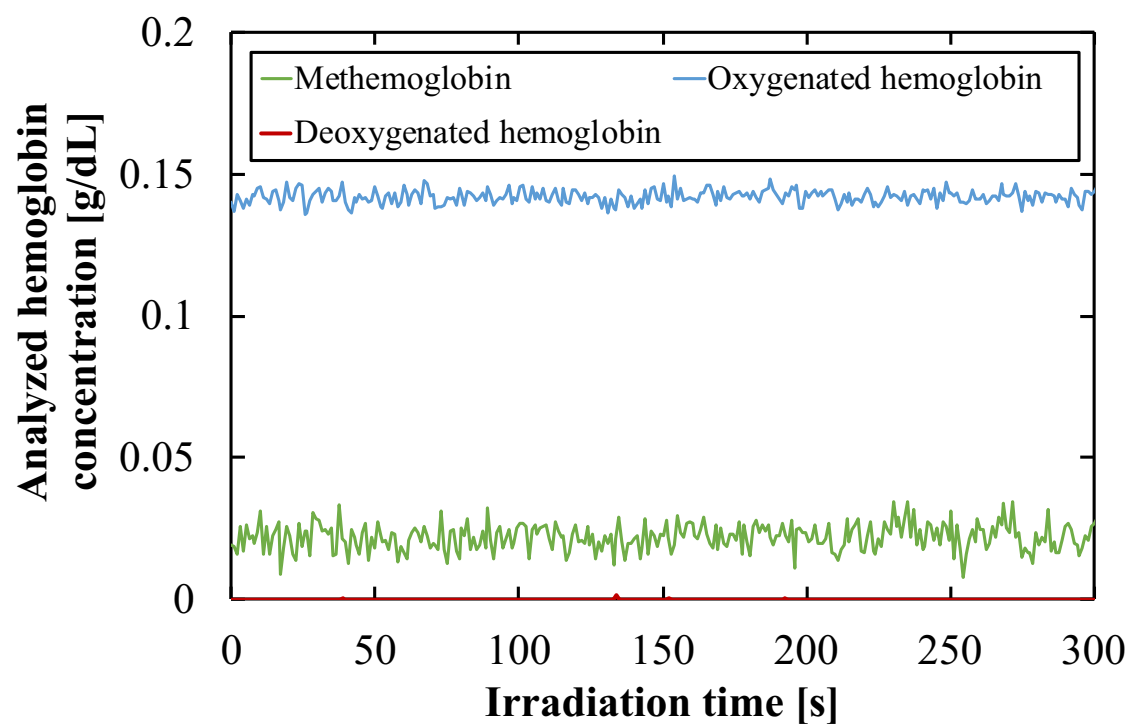
500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm

0.75 nm



6-23 Φ
(N=5)

— Methemoglobin
— Deoxygenated hemoglobin
— Oxygenated hemoglobin
— Oxygen saturation



6-24 Φ

(N=1)

7 1

7.1□

(6.5) 7
(i)
(ii)

7.2□

1

7.2.11

1 6.2.1 0.625 0.938
30 □g/mL A B
6.4.1 60 mW/cm²
20 J/cm² (333 s)
6.5.1 19 ms
0.75 nm 1 s 333 6.4.2 (6.3)
6.5.1 6.3.1.2
(6.2.1
)

7.2.21

1 7-1, 7-2 A B
7-3
7-4
A
B 0.40±0.03 0.56±0.05 6.2.1

2.0%

7-3 3

(t+5) [s] t [s]

d (t) d (t)

7-5 1 2 d (t) 0 [s]

t₀ (t₀+2) [s] 2 3 d (t) 0 [s]

t₁ (t₁+2) [s] 7-1 A B

1 2

3 1 A

B 80.3±6.5 s (N=5) 88.2±6.2 s (N=4) p 0.1

t₀) 109.5 s 149.1 s 2 A B (t₁-

1.36 2 A

1 A B 1

1

S (4.3.2) 80 mmHg

5

[1] 1

S 80 mmHg A B

1.38 2

1.36 2

2

in vitro

7.3□

pH [1-4] 7.3
pH

pH

[5]

7.3.11

7.2 A 7-6
T
/
(701265, ,)
6.4.1 60 mW/cm² 290 s
0.2 s (DL750,
,) 0.1
5 s 7-7
pH pH
[6] pH (8220BNWP, ,
)
pH 3 mm□ 6 7.2 1 mm□10 mm
5 mm□10 mm 15
mm□ 663 nm
6-17
pH (Orion Star™ A221,
,) 60 mW/cm² 340 s
pH 5-20 s pH
7 s pH pH4.01 pH7.00
pH 25

7.3.21

1 7-8
27.0±0.0
(7.1)

係をもつことが報告されている [1-3]。

$$\Delta \log(pO_2) = 2.4 \times 10^{0.2} \Delta T \quad (7.1)$$

式 (7.1) より、血液試料温度 $27 \pm 0^\circ\text{C}$ に対応したヘモグロビン酸素解離曲線を得るためには、報告されている標準状態 (37°C) におけるヘモグロビン酸素解離曲線に対して式 (7.2) の補正を行う。

$$pO_{2,456674895\text{ n,T}}(t) = pO_{2,\text{R7gula6}} \times 10^{0.24 \times 10^{-1}} \quad (7.2)$$

ここで $pO_{2,456674895\text{ n,T}}$ は報告されている標準状態でのヘモグロビン酸素解離曲線において試料温度を考慮し補正した酸素分圧である。 $pO_{2,\text{R7gula6}}$ は標準状態における酸素分圧の報告値である。励起レーザ光照射中の温度変化は確認されなかったため、補正值は励起レーザ光照射時間に依存しない。

図 7-9 に励起レーザ光照射中の血液試料溶液の pH 変化を示す ($N=1$)。ガラス電極を用いた測定法では、pH に感度を持つガラス膜は以下の式 (7.3) に示す Nerunst の式が成り立つことを利用している。

$$E = \frac{RT}{F} \log 3\text{H}^{+6} \quad (7.3)$$

ここで E は電位、 T は絶対温度、 F はファラデー定数を示す。図 7-8 より励起レーザ光照射中の温度は一定なので式 (7.3) における電位 E は $\log 3\text{H}^{+6}$ 、すなわち pH のみに依存する [6, 7]。このとき、pH 測定器の設定温度 25°C に対して溶液温度の実測値は 27°C であったため、式 (7.3) より実測 pH 値に対して $(273.15+25)/(273.15+27)$ を積算し補正した。励起レーザ光照射中において血液試料の pH は 6.7 ± 0.1 であった。図 7-9 に示す励起レーザ光照射時間に対する pH 変化を直線近似すると式 (7.4) が得られる。ここでこの近似直線の絶対係数 R^2 は 0.99 であった。

$$\text{pH}(t) = -1.1 \times 10^{0.3} t + 6.9 \quad (7.4)$$

ヘモグロビン酸素解離曲線は pH に依存し、式 (7.5) 関係をもつことが報告されている [1, 3, 4]。

$$\Delta \log(pO_2) = -4.8 \times 10^{0.1} \Delta \text{pH} \quad (7.5)$$

式 (7.5) より、血液試料の pH に対応したヘモグロビン酸素解離曲線を得るためには、報告されている標準状態 (pH 7.4) におけるヘモグロビン酸素解離曲線に対して式 (7.6) の補正を行う。

$$\begin{aligned} pO_{2,456674895\text{ n,pH}}(t) &= pO_{2,\text{R7gula6}} \times 10^{(0.48 \times 10^{-1} \times (0.11 \times 10^{-3} t + 6.9))} \\ &= pO_{2,\text{R7gula6}} \times 10^{(5.3 \times 10^{-4} t + 2.4 \times 10^{-1})} \end{aligned} \quad (7.6)$$

ここで $pO_{2,456674895\text{ n,pH}}$ は標準状態でのヘモグロビン酸素解離曲線において pH を考慮し補正した酸素分圧である。

7.3.3 試料条件に対応するヘモグロビン酸素解離曲線

式 (7.3) と式 (7.6) を合わせると、血液試料の励起レーザ光照射中における温度と pH 条件を考慮し補正したヘモグロビン酸素解離曲線における酸素分圧 ($pO_{2,45667485n,T,pH}$) は次の式 (7.7) である。

$$\begin{aligned} pO_{2,45667485n,T,pH}(t) &= pO_{2,R7gula6} \times 10^{0.24 \times 10^{-1}} \times 10^{(5.3 \times 10^{-4}t + 2.4 \times 10^{-1})} \\ &= pO_{2,R7gula6} \times 10^{5.3 \times 10^{-4}t} \end{aligned} \quad (7.7)$$

報告されている標準状態におけるヘモグロビン酸素解離曲線に対して、本実験における試料の温度および pH 条件に合わせて補正を行った酸素解離曲線を図 7-10 に示す。

7.4 酸素電極法による酸素分圧測定

7.3 部において励起レーザ光照射中の血液試料条件にあったヘモグロビン酸素解離曲線を求めた。この曲線を参照することで、提案計測法で得た酸素飽和度から酸素分圧を変換可能である。このようにして求めた酸素分圧変化の妥当性を検討するために、標準的な測定法である酸素電極法による酸素分圧変化を測定する。

7.4.1 実験方法

図 7-11 に酸素電極法を用いた励起レーザ光照射中の血液試料の酸素分圧測定系を示す。酸素分圧測定は表面がテフロン膜で被覆されているクラーク型酸素電極 (POE-10N, バイオリサーチセンター, 名古屋) と不関電極 (POR-10N, バイオリサーチセンター, 名古屋) を溶液内に設置し、酸素電圧モニター (PO2-100, バイオリサーチセンター, 東京) により計測を行った。白金線の酸素電極側面はポリウレタンとエポキシでコートされており、先端部は酸素透過膜を有する。この酸素電極の外径は 200 μm であり、ポリプロピレン膜によって蛋白質分子が陰極につく分極現象が抑制されている。酸素電極を用いた酸素分圧測定は、ポーラログラフの原理を用いてファラデー電流値から酸素分圧値を求める [7, 8]。200 $\mu\text{m}\Phi$ の酸素電極と 100 $\mu\text{m}\Phi$ の不関電極にそれぞれ負電圧と正電圧を印可することで式 (7.8) に示す酸化還元反応が生じる



酸素電極表面での溶存酸素のファラデー電流を測定し、その値を酸素分圧に変換する。(7.8) の酸化還元反応は、溶液温度による影響を大きく受けるため、室温 (27 $^{\circ}\text{C}$) に長時間放置した純水で較正を行い、出力電圧 500 mV を酸素分圧 155 mmHg に対応させた。血液試料には、7.2.1 節の血液試料 A と同条件の試料溶液を用いた。図 7-11 に示すように酸素電極の先端がこの血液試料の吸収スペクトル測定領域に位置するよう配置した。60 mW/cm^2 で 290 s 光照射しているときの血液試料の酸素分圧を時間間隔 0.2 s で連続的に測定した。ここで、酸素分圧計測を開始してから 12 s 後に励起レーザ光照射を開始した。励起レーザ光照射開始時の測定電圧値と光照射終了時の測定値を基準として、それぞれが 1 と 0 となるよう規

7.4.21

1 7-12

(N=1)

7.5□

1 7.4

(7-12) 7.3.3

A

7-13

(53 s)

S

[7]

90%

90

113 s

0.98

10%

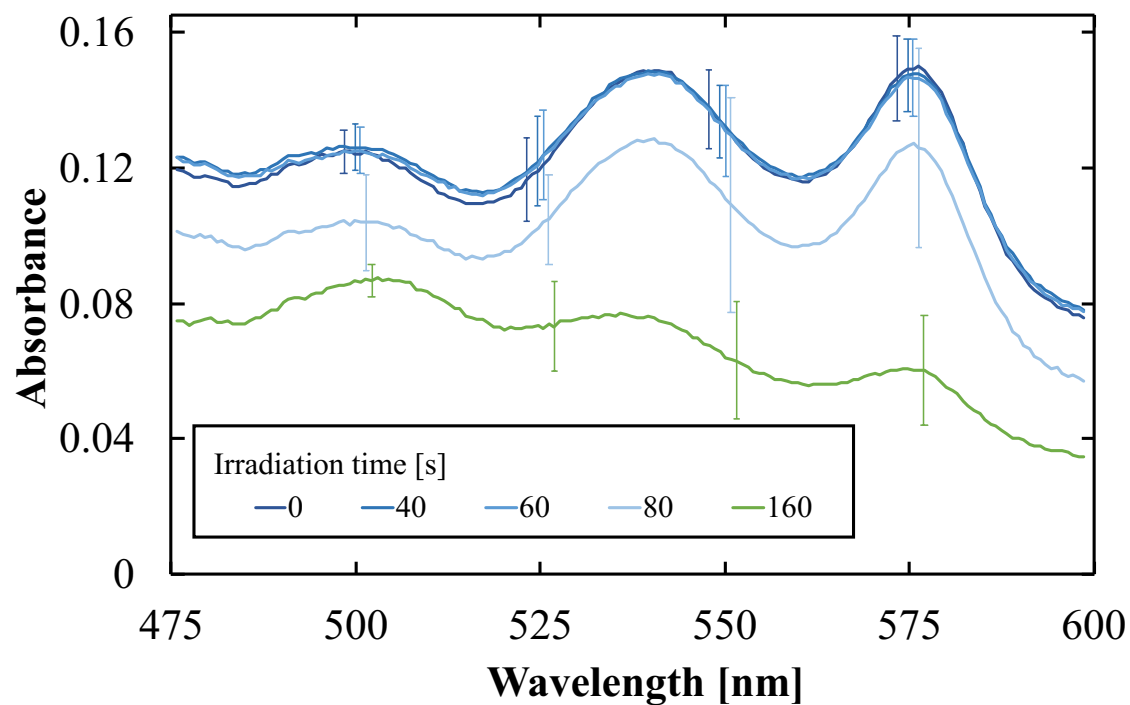
2-5

[9]

7.6□

1

- [1] J. W. Severinghaus, "Blood gas calculator," *J. Appl. Physio.*, vol. 21, pp. 1108-1116, 1966.
- [2] P. Astrup, K. Engel, E. Munson, and J. W. Severinghaus, "The influence of temperature and pH on the dissociation curve of oxyhemoglobin of human blood," *Stand. J. Clin. Lab. Inveht*, vol. 17, pp. 515-523, 1965.
- [3] W. E. L. Brown and A. V. Hill, "The oxygen-dissociation curve of blood, and its thermodynamical basis," *Proc. R. Soc. Lond. B*, vol. 94, pp. 297-334, 1923.
- [4] A. E. Hellegers and J. J. P. Schrufer, "Nomograms and empirical equations relating oxygen tension, percentage saturation, and pH in maternal and fetal blood," *Am. J. Obstet. Gynecol.*, vol. 81, pp. 377-384, 1961.
- [5] W. G. Zijlstra and A. Buursma, "Spectrophotometry of hemoglobin: absorption spectra of bovine oxyhemoglobin, deoxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin," *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 118, pp. 743-749, 1997.
- [6] ;
http://www.tactec.co.jp/download/pdf/hamilton_pH_info_1.pdf (2018/10/26).
- [7] , : , 2006, pp. 4-106.
- [8] , , 1977, pp. 1-25.
- [9] J. Moan and S. Sommer, "Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells," *Cancer Res.* vol. 45, pp. 1608-1610, 1985.



7-11

A

(N=5)

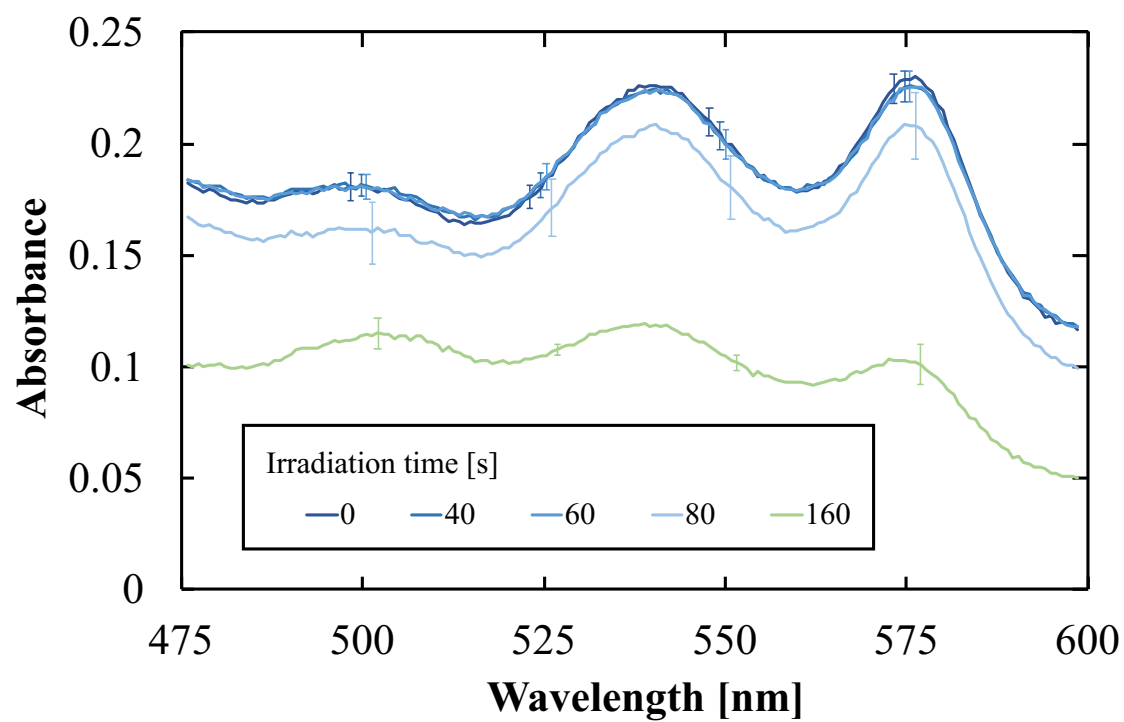
19 ms

0.75 nm

1 s

500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm

0.75 nm



7-21

B

1(N=4)

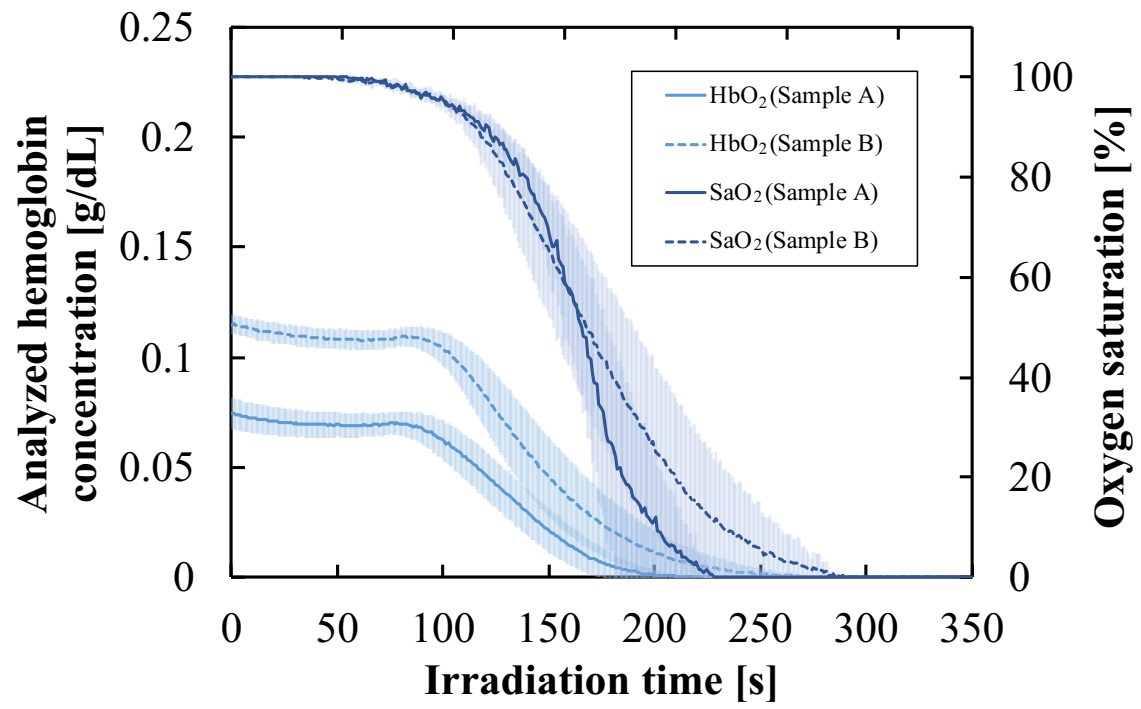
19 ms

0.75 nm

1 s

500 nm, 525 nm, 550 nm, 575 nm

0.75 nm

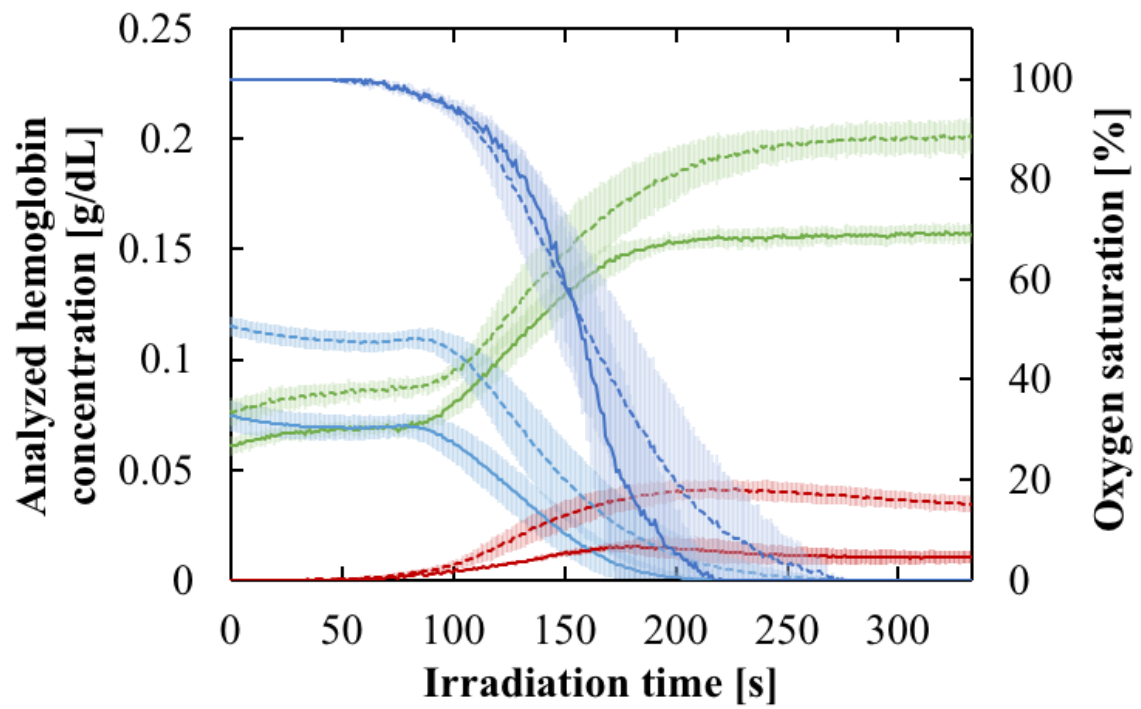


は31

A

B

(N=4-5)1



いばさ

A

B

(N=4-5,

いばさ)

— Methemoglobin

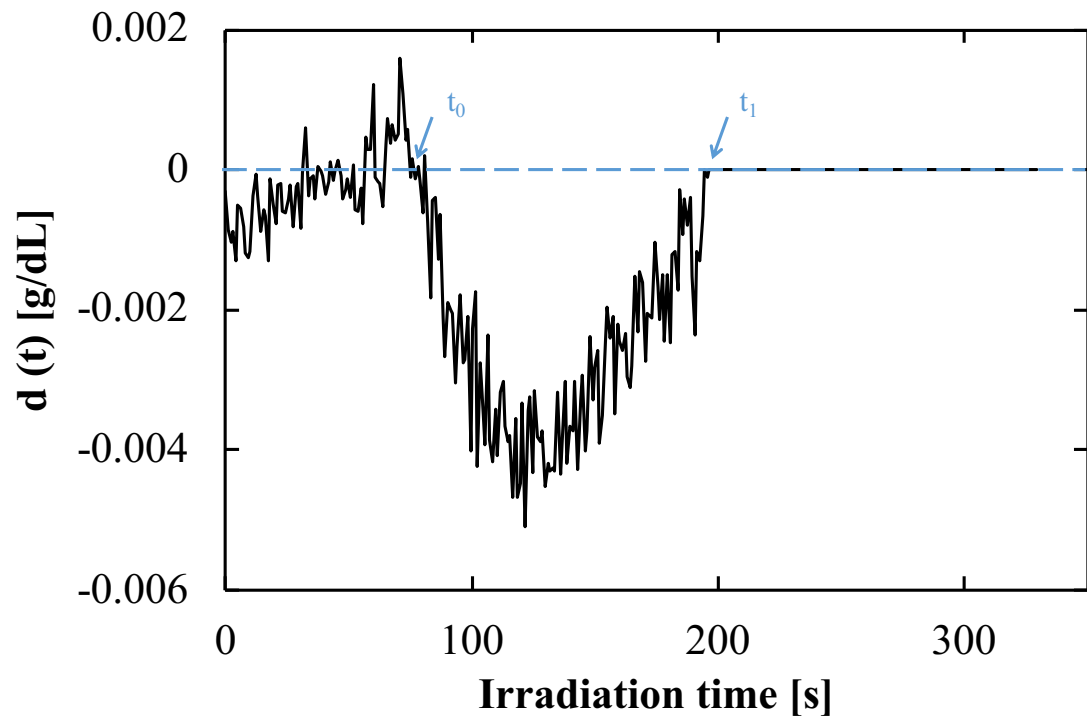
— Oxygenated hemoglobin

— Deoxygenated hemoglobin

— Oxygen saturation

A

B



7-51

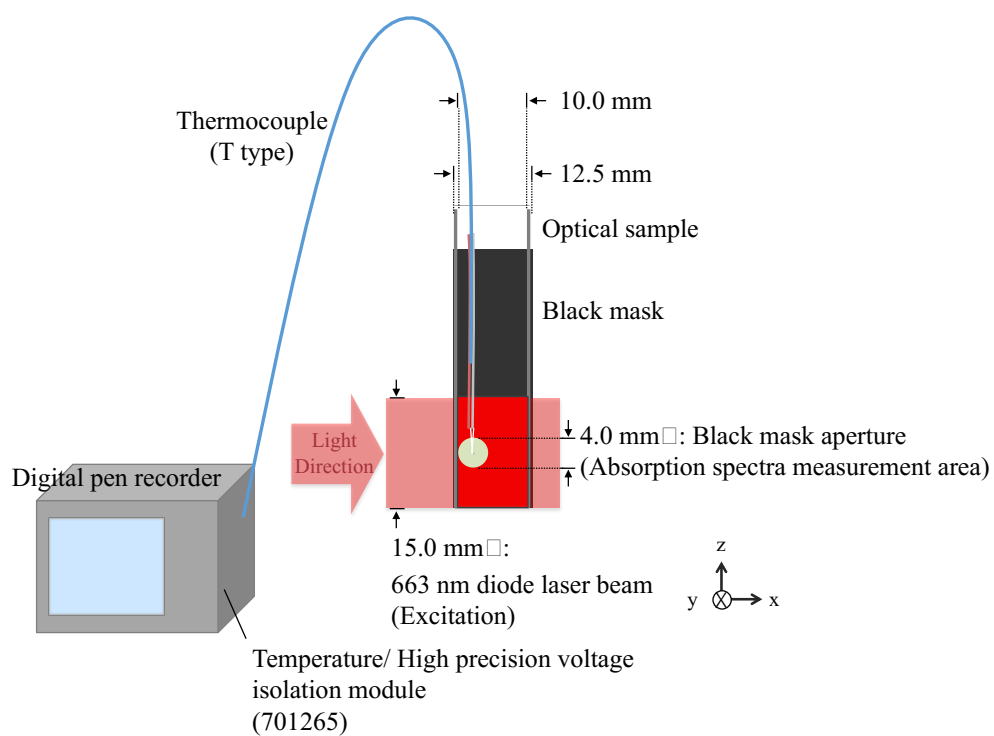
A

 $(t+5)$ [s] t [s]

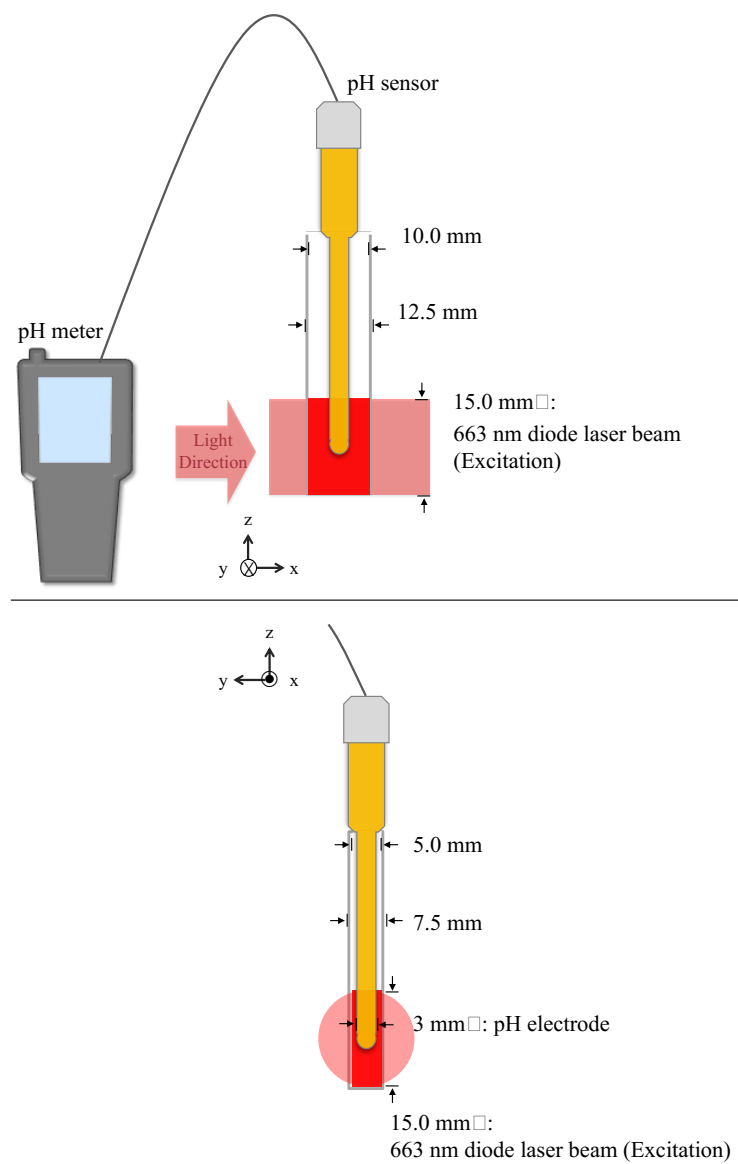
7-3

7-4

	7-11	A	B	3
1	Hematocrit [%]	1 st phase [s]	2 nd phase [s]	3 rd phase [s]
Sample A	0.40±0.03 (N=5)	0~80.3±6.5	80.3±6.5~189.8±17.0	189.8±17.0. 5-333.0
Sample B	0.56±0.05 (N=4)	0~88.2±6.2	88.2±6.2~237.3±27.1	237.3±27.1 333.0

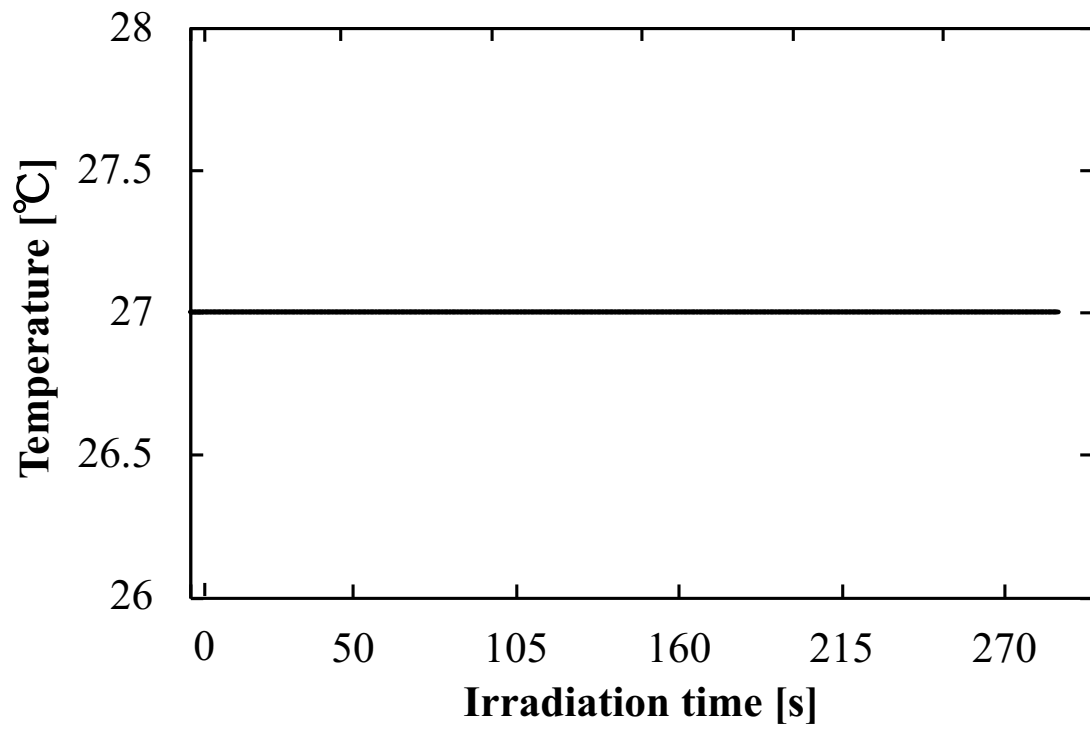


7-61



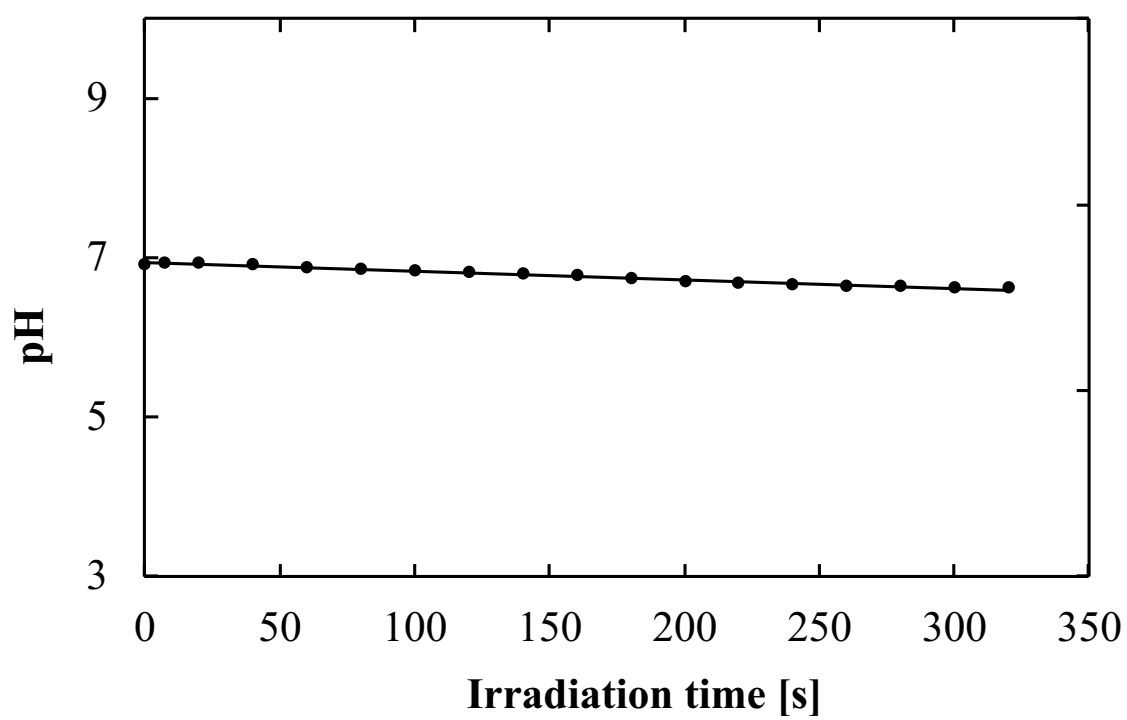
7-71

pH



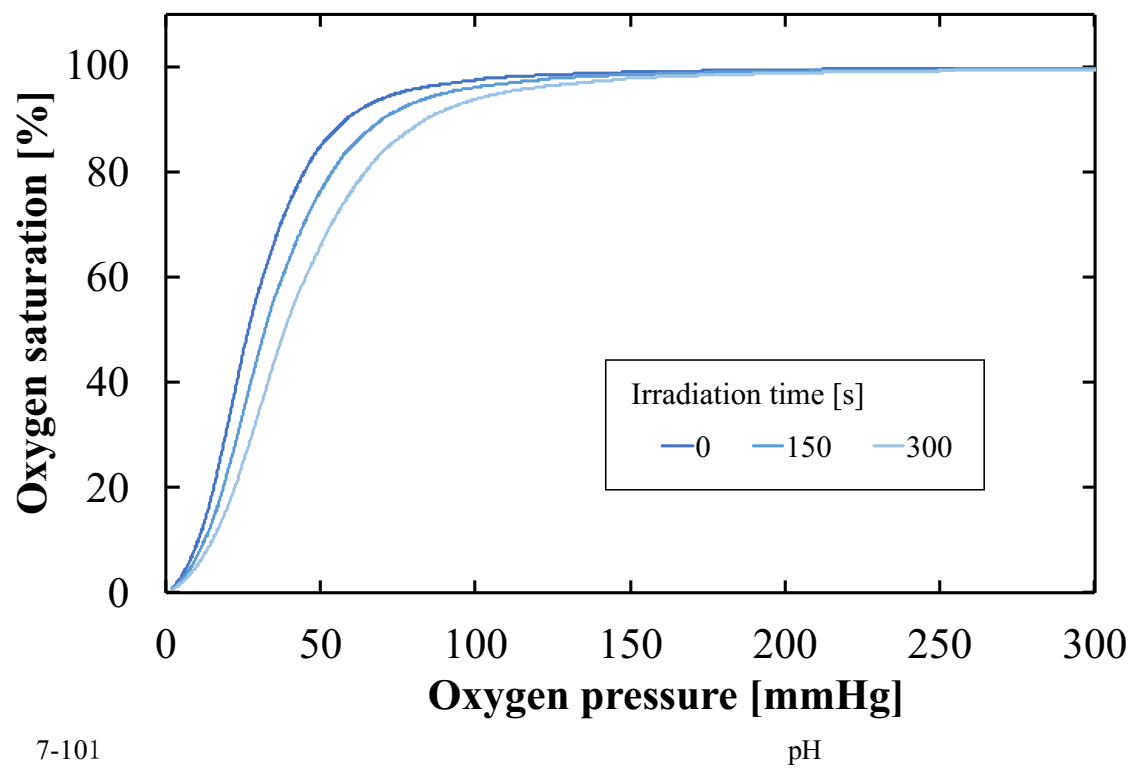
1381

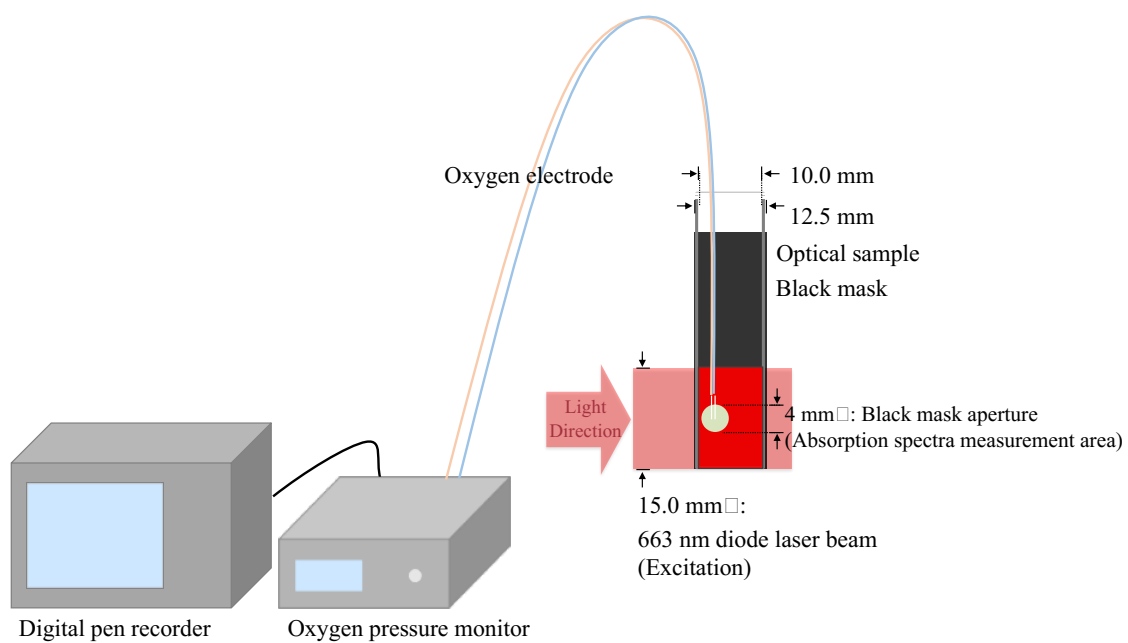
N=1



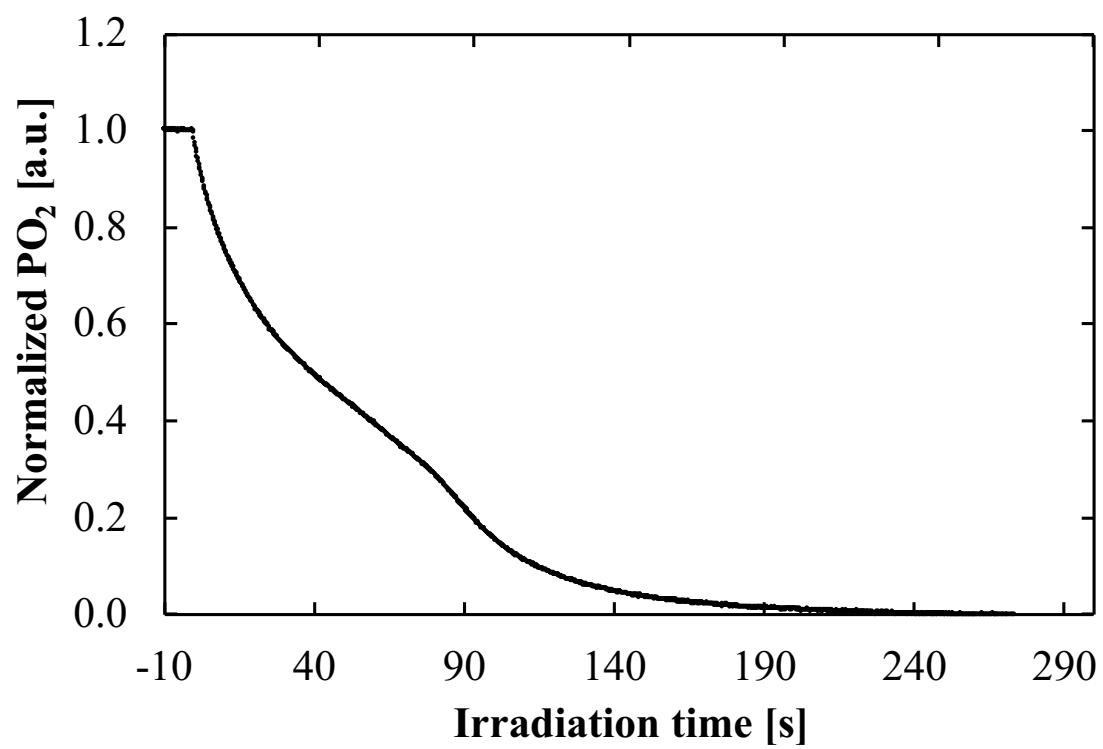
7-91

pH (N=1)



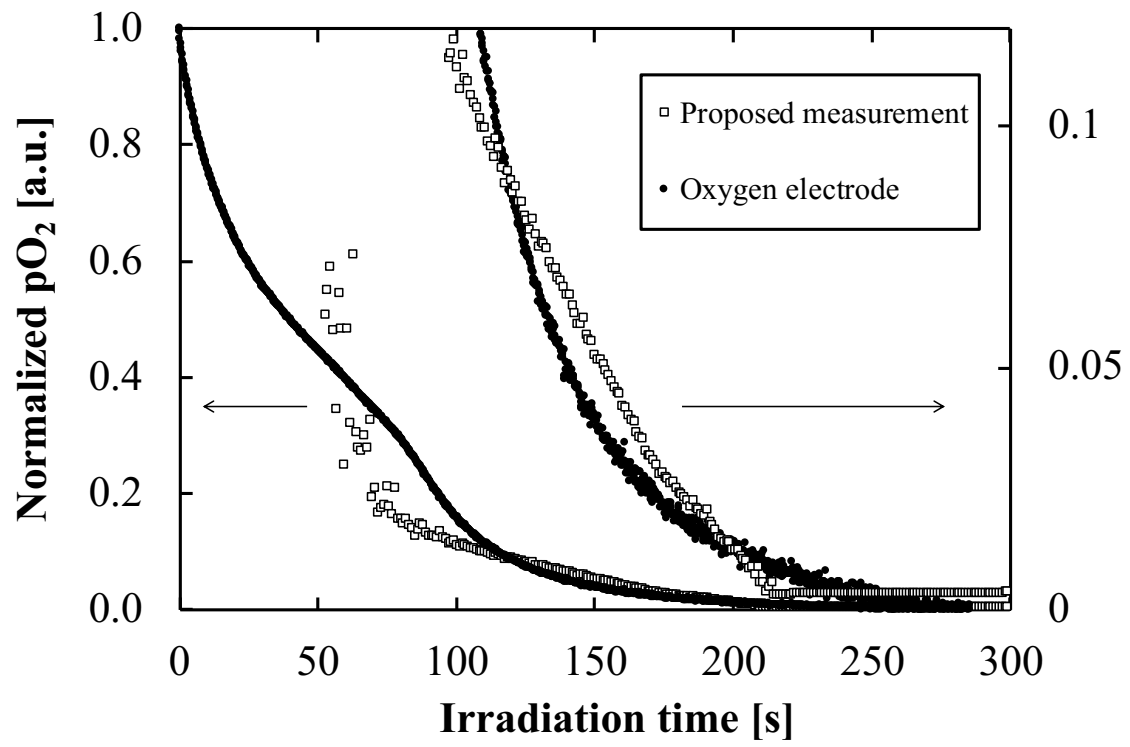


7-111



7-121

(N=1)



7-131

7-3 Sample A

挿入

(

(131)

第 8 章 提案計測法によって得られる酸化動態

8.1 緒言

提案計測法により励起レーザ光照射中に血液試料のメトヘモグロビン濃度が増加することを確認した (6.5 部)。これは、光増感反応の最終産生物である一重項酸素により赤血球膜が破裂し遊離したヘモグロビンが酸化作用を受けたためである。第 8 章では、赤血球膜破裂と遊離ヘモグロビンの酸化関係を明らかにするために、提案計測法により得られたメトヘモグロビン濃度と溶血度との関係を調査する。光増感反応による酸化動態を検討することを目的に、光感受性薬剤蛍光量の減衰とアルブミンを加えたときの各種ヘモグロビン濃度変化を調査した。

8.2 メトヘモグロビン濃度と溶血度の関係

提案計測法により測定したメトヘモグロビン濃度は赤血球膜破裂により遊離したヘモグロビンの発生量に応じた酸化産生物であると考えられる。そこで、メトヘモグロビン濃度変化から溶血の発生を間接的に測定できると予想する。本 8.2 部では、提案計測法より測定したメトヘモグロビン濃度に対応する溶血度の関係を検討するために、溶血度評価として一般的に用いられている試料上清の吸光度測定 [1] (4.4.2 節参照) により溶血度を調査する。

8.2.1 実験方法

6.5.1 節で作製したタラポルフィンナトリウム 30 $\mu\text{g/mL}$ 、ヘマトクリット値 0.625% の血液試料に対し、6.4.1 節に記載した実験系を用いて励起レーザ光を放射照度 60 mW/cm^2 にて、放射照射量 1.25-20 J/cm^2 で光照射を行った。励起レーザ光照射後、血液試料を遠心分離機 (テーブルトップ冷却遠心機 2800; 5.4.1 節と同じ) を用いて回転数 1700 rpm (923 $\times g$)、15°C で 5 min 遠心した。本実験では陰性対照液として生理食塩水、陽性対照液としてヘマトクリット 0.625% に該当する赤血球数を蒸留水に溶解させ完全溶血を起こした血液試料を用いた。陽性対照液にも同条件の遠心分離を行った。遠心分離後、積分球を装着した紫外可視近赤外分光光度計 (UV3600; 6.2.1 節と同じ) を用いて血液試料の上澄み液の波長 522 nm における吸光度を計測した。溶血度は、4.4.2 節にて述べた医療機器 Good Laboratory Practice (以下、GLP) 試験における血液適合性試験において定められている再掲する式 (4.8) に基づき算出した [1]。

$$H = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{Ref.}/023}}{A_{\text{Ref.}/435\ 607.1} - A_{\text{Ref.}/023}} \times 100 \quad \text{p4.81}$$

ここで、 H は溶血度 [%]、 A_{sample} は試験液上清の吸光度、 $A_{\text{Ref.}/023}$ は陰性 (非溶血) 対照液上清の吸光度、 $A_{\text{Ref.}/435\ 607.1}$ は陽性 (完全溶血) 対照液上清の吸光度を指す。本実験では GLP

試験と同じ陰性対照液と陽性対照液を用いた [1]。GLP 試験では、酸素化ヘモグロビンが主に存在する試料に対しては酸素化ヘモグロビンの最大吸収波長 540 nm または 576 nm における吸光度を測定する第 I 法を用いて溶血率を算出する。メトヘモグロビン等の吸収を認めた場合にはシアン化カリウムを含む Drabkin 試薬を用いて総ヘモグロビンをシアンメトヘモグロビンに変換し波長 540 nm における吸光度を測定する第 II 法を用いて溶血率を算出する [1]。この操作では、試験液上清に含まれるヘモグロビン濃度が破裂した赤血球内のヘモグロビン量を示すことを利用している。血液試料内のヘモグロビンを単一種とし、そのヘモグロビン種の可視光領域におけるピーク波長での吸光度からヘモグロビン濃度を求めて溶血度を推定している。本実験では、試料内に酸素化ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビン、メトヘモグロビンが含まれるため上記の第 II 法に該当するが、試薬等を用いないより簡便かつ安全な手法を用いるために、3 種類のヘモグロビンの等吸収点である 522 nm の吸光度から破裂した赤血球内のヘモグロビン濃度を示唆する試料上清の含有ヘモグロビン濃度を求め溶血度を推定した。

8.2.2 実験結果および考察

図 8-1 に各励起レーザ光照射時間における実測した溶血度を示す。光照射時間 0 s と 21 s における溶血度は有意差内で同じであった。このことより、赤血球膜破裂による溶血が発生しているのは励起レーザ光照射時間 21 s 以降であると考えられる。各励起レーザ光照射時間に対応する提案計測法により測定したメトヘモグロビン濃度 (6.5 部) と上記の溶血度の関係を図 8-2 に示す。メトヘモグロビン濃度と溶血度には正の相関があることが確認された。得られたメトヘモグロビン濃度に対する溶血度の線形近似式は式 (8.1) を得た。このとき、決定係数 R^2 は 0.93 であった。

$$y = 498x - 15 \quad \text{p8.11}$$

ここで y は溶血度 [%]、 x はメトヘモグロビン濃度 [g/dL] を指す。

溶血により遊離したヘモグロビンのうち酸化作用を受けメトヘモグロビンになる割合を検討するために、破裂した赤血球内の総ヘモグロビンに対するメトヘモグロビンの産生率を求める。図 8-2 の縦軸に示す溶血度は、遠心分離した血液試料の上清すなわち膜破裂が起きた赤血球内の総ヘモグロビン溶液の吸光度測定より算出された値である。よって、図 8-2 で示す溶血度は膜破裂が起きた赤血球内の総ヘモグロビン濃度と比例関係にある。ヘマトクリット値 0.625% の血液試料における溶血発生増加率 [%] ($\angle y$) に対する総ヘモグロビン濃度増加量 [g/dL] ($\angle x$) は、単位体積あたりの赤血球数 (RBC)、赤血球 1 個あたりの平均ヘモグロビン量 (MCH)、赤血球体積割合のヘマトクリット値 (HCT) を用いて式 (8.2) より求められる。ここで兎血液におけるそれぞれの報告値 (RBC : 6.33 ± 0.41 [$\times 10^6/\mu\text{L}$], MCH : 21.6 ± 1.3 [pg], HCT : 43.1 ± 2.4 [%]) を用いた [2]。

$$\frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{1}{pRBCl \times pMCHl} \times \frac{HCT}{0.625} \times 100 = 504 \pm 53 [\%/pg/dL] \quad p8.21$$

式 (8.1) より、図 8-2 に示す提案計測法により得たメトヘモグロビン濃度と溶血度との関係を線形近似すると傾き 498 [%/pg/dL] である。これは、破裂した赤血球内の総ヘモグロビン濃度と溶血度との関係を示す式 (8.2) の傾きの値と誤差範囲内で一致する。このことより、本研究で用いた実験条件下において破裂した赤血球内のヘモグロビンは全量が一重項酸素による酸化作用を受けメトヘモグロビンになると考えられる。すなわち、提案計測法の原理であったメトヘモグロビン濃度変化に注目することで間接的に赤血球破裂を測定することができる。

8.3 励起光照射中における光感受性薬剤蛍光量変化

光感受性薬剤は、光増感反応の最終産生物である一重項酸素から酸化作用を受けると分子構造が変化し蛍光が発生しなくなる。すなわち光感受性薬剤の蛍光量の減衰は一重項酸素の産生量と相関があり、光感受性薬剤の蛍光量の減衰により光増感反応の進行を間接的に捉えることができる [3, 4]。本 8.3 部では、血液試料に含まれるヘモグロビンの酸化進行の検討を行うために、励起レーザ光照射中の血液試料に含まれるタラポルフィンナトリウムの蛍光量変化を調査する。

8.3.1 実験方法

タラポルフィンナトリウムは波長 670 nm 付近に蛍光を発する [2]。7.2.1 節で測定した血液試料 A への励起レーザ光照射中の分光器で計測した分光器検出カウント数のうちのタラポルフィンナトリウムの蛍光ピーク波長である 670 nm 付近に注目する。波長 670.7 nm を中心とし、前後 5 つの測定波長点を含む 667.8-674.4 nm (測定波長間隔 0.75 nm) の各波長における分光器検出カウント数を加算し総和カウント数とした。赤血球を含まないタラポルフィンナトリウム 35 µg/mL の光学試料に対しても同じ方法で励起レーザ光照射中の蛍光量の総和カウント数を得た。7.2.1 節の血液試料 A と同条件の試料溶液 (ヘマトクリット値 0.40%、タラポルフィンナトリウム 30 µg/mL) に対し、6.4.1 節に記載した実験系を用いて励起レーザ光を放射照度 60 mW/cm² で放射照射量 2.5、6、7.5、9、10、40 J/cm² となるまで照射し、励起レーザ光照射後の血液試料を撮像した。

8.3.2 実験結果および考察

図 8-3 に励起レーザ光照射中の血液試料 A の波長 667-674 nm におけるスペクトルの経時変化の一例を示す。タラポルフィンナトリウムを含まない血液試料では波長 670 nm 帯でのピークを示さなかった。このことより図 8-3 に示す波長 670 nm 帯ピークはタラポルフィンナトリウムの蛍光であろう。励起レーザ光照射中の血液試料 A の波長 667-674 nm における

総和カウント数の時間変化を図 8-4 に示す。このとき、励起レーザ光照射開始時の総和カウント数で規格化した。総和カウント数は、光照射時間 0-60 s で減少、60-92 s で増加し、92 s 以降で再び減少した。各励起レーザ光照射条件終了後に撮像した血液試料を図 8-5 に示す。光照射時間 42 s において血液試料は全体的に散乱が大きい溶液だが、光照射時間 100 s において励起レーザ光照射端側に散乱が小さい領域が確認でき、この領域は光照射時間に伴い広がった。すなわち、励起レーザ光照射時間 42 s と 100 s の間で血液試料の蛍光量測定領域において血液試料の顕著な散乱特性変化が生じている。励起レーザ光照射時間 0-42 s と 100-189 s における時間に応じた蛍光量変化の線形近似式はそれぞれ式 (8.3) および (8.4) を得た。このときの決定係数 R^2 はともに 0.99 であった。ここで、189 s は、7.2.2 節において述べた血液試料 A の酸素化ヘモグロビンが消滅したタイミングである。

$$I = -2.4 \times 10^{-3}t + 1.0 \quad \text{p8.31}$$

$$I = -1.3 \times 10^{-3}t + 1.1 \quad \text{p8.41}$$

ここで I はタラポルフィンナトリウムの蛍光量を示す波長域 667-674 nm における各波長の総和カウント数を、光照射開始時を基準に規格化した値を指す。 t は励起レーザ光照射時間を指す。血液試料の散乱特性変化が起こる時間帯を除き、タラポルフィンナトリウムの蛍光量は単調に減少していることより、励起レーザ光照射開始より光増感反応は連続的に進行していると考えられる。図 8-6 にタラポルフィンナトリウムのみの光学試料に対する励起レーザ光照射中の波長域 667-674 nm における総和カウント数の時間変化を示す。総和カウント数の時間変化は単調減少しており、線形近似式は式 (8.5) を得た。このときの決定係数 R^2 は 0.98 である。

$$I = -8.0 \times 10^{-4}t + 9.7 \times 10^{-1} \quad \text{p8.51}$$

タラポルフィンナトリウムの蛍光量は励起レーザ光照射時間に伴い減衰すると考えられている [3,4]。これは、タラポルフィンナトリウムが光増感反応の最終産生物である一重項酸素から酸化作用を受け分子構造が変化するためである。しかし、図 8-4 に示すようにタラポルフィンナトリウムの蛍光量は光照射時間 60-92 s において増加した。これは、図 8-5 に示すように、光照射時間 42 s と 100 s の間で光増感反応進行に伴い赤血球膜破裂が起き、蛍光量測定領域において赤血球混濁液からヘモグロビン溶液に変化したことで散乱が小さくなったことに起因すると考えられる。図 8-1 に示す励起レーザ光照射時間と溶血発生の関係からも、光照射時間 42 s 以降で赤血球膜破裂が発生していると解釈できる。同濃度の蛍光物質が異なる散乱体の試料に含まれている場合、散乱が大きい試料では発生した蛍光が散乱体に当たる確率が高いため、散乱体が小さい試料よりも検出される蛍光量が少なくなると考えられる。励起レーザ光照射時間 60-92 s では、光増感反応の進行によるタラポルフィンナトリウムの蛍光量減少の要因よりも、血液試料の散乱が小さくなることで検出される蛍光量増加の要因が上回ったためタラポルフィンナトリウムの蛍光量が増えた測定結果となったと予想する。図 8-5 において励起レーザ光照射 100 s 以降では、蛍光量測定領域に

α (8.3) (8.4) 0-42
s () 100-189 s () 1.8

7-4 1 (0-42 s) 7.2.2 2 ()
100-189 s) 8-4
189 s

8.4□
 α

[5]
8.4

8.4.1 α 2.1
 α 6.2.1
mg/mL DMEM+ α (5.3.1) α 0.625%
6.5.1

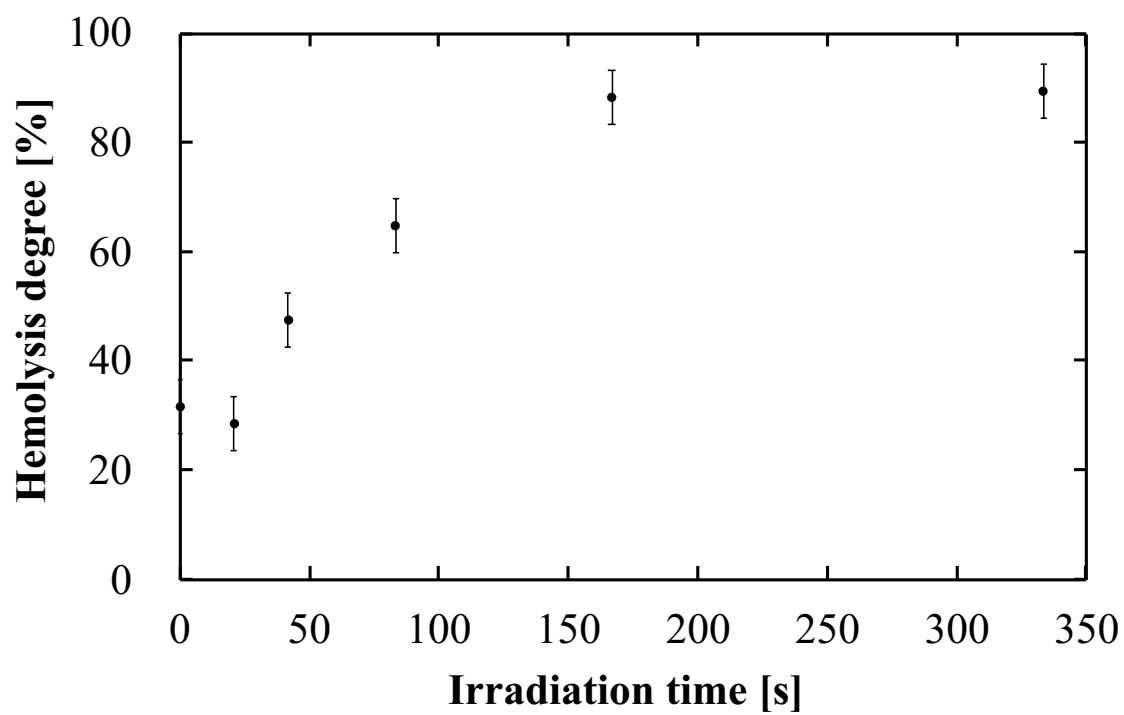
8.4.2 α
 α 8-7 2.1 mg/mL
20 s
20 s
6.5 7.2
1/9

10^8 - 10^9

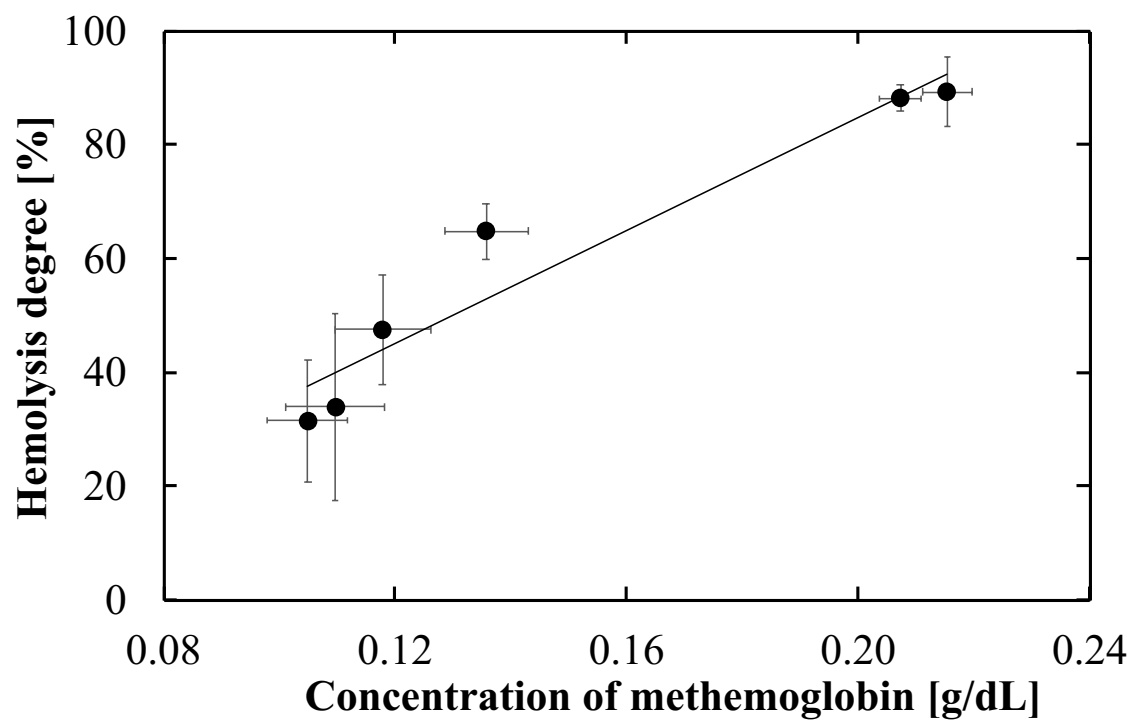
[5]

8.5 □

- [1] □ 0301 20 , “
 ,” α 24 3 1 .
- [2] □ O. W. Schalm, N. C. Jain, E. J. Carroll, *Veterinary hematology*. (3rd edition), Philadelphia: Lea & Febiger, 1975, pp. 219-227.
- [3] □ J. D. Spikes and J. C. Bommer, “Photobleaching of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 58, pp. 346-350, 1993.
- [4] □ J. S. Dysart, G. Singh, and M. S. Patterson, “Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 81, pp. 196-205, 2005.
- [5] □ L. Sheyhedin, K. Aizawa, M. Araake, H. Kumasaka, T. Okunaka, and H. Kato, “The effects of serum on cellular uptake and phototoxicity of mono-l-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in vitro,” *Photochem. Photobiol.*, vol. 68, pp. 110-114, 1998.

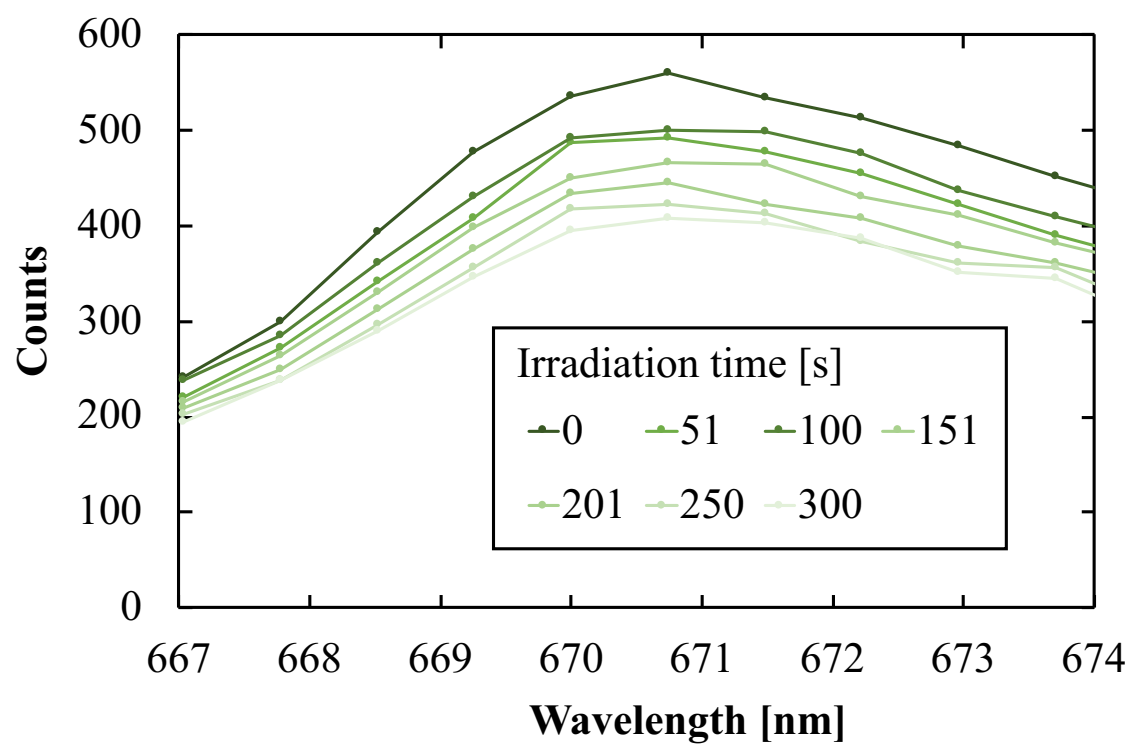
8-1 α

(N=4-5)



8-2 α

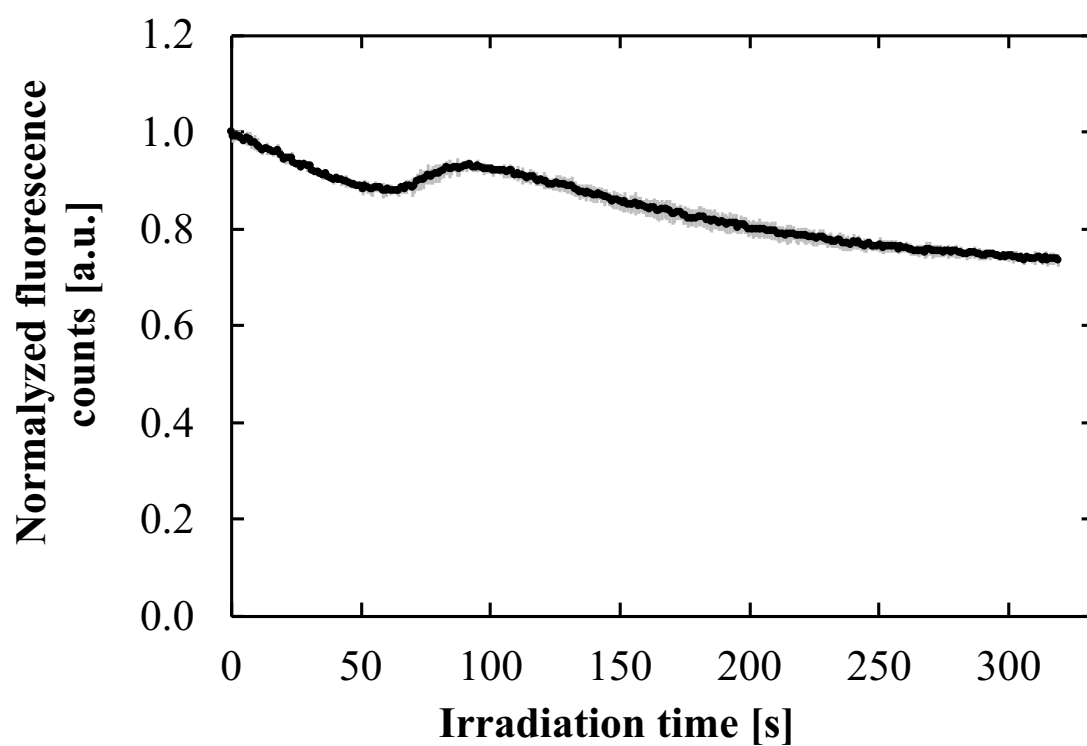
(N=4-5)



8-3

670 nm

50 s

8-4 α

667.8-674.4 nm

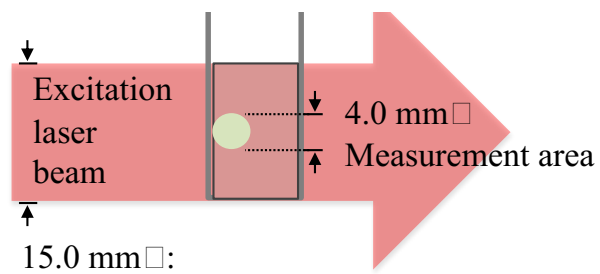
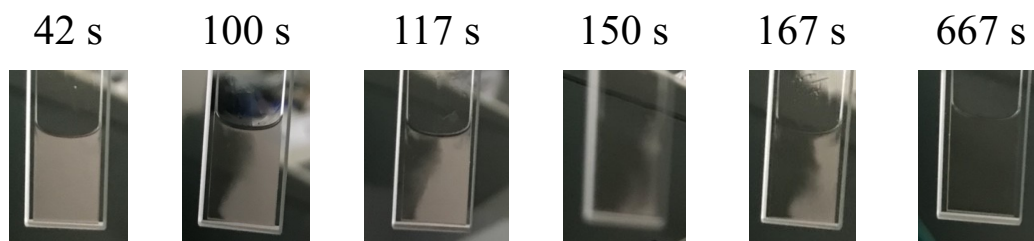
(N=5)

19 ms

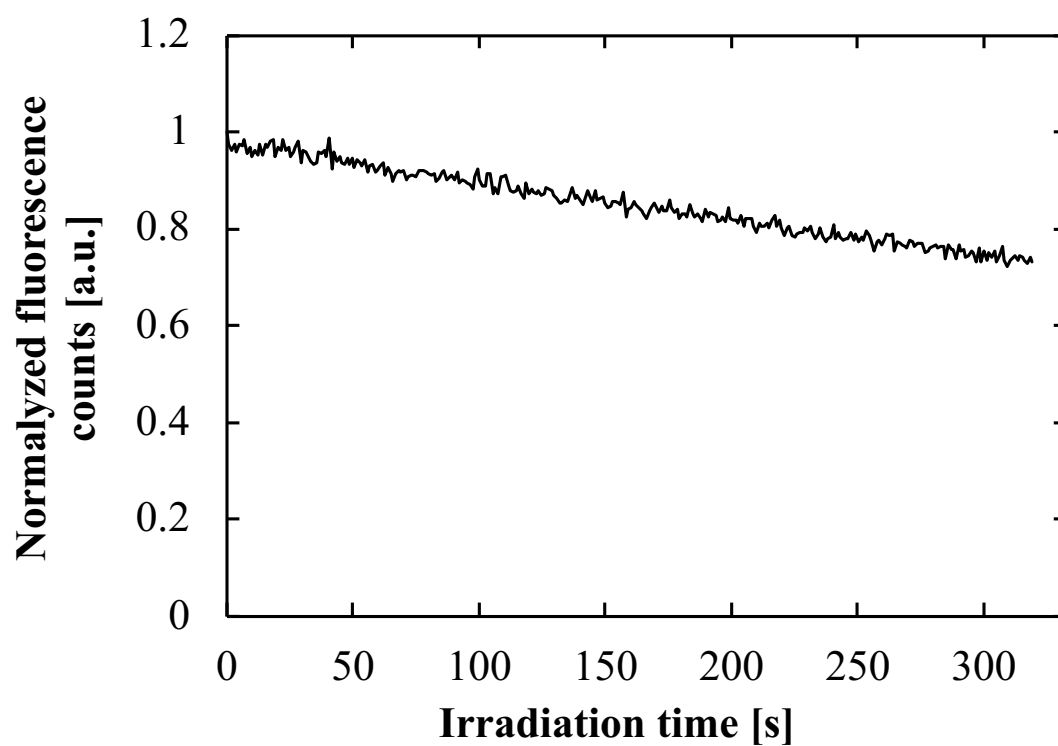
0.75 nm

1 s

Irradiation time:



8-5 α

8-6 α

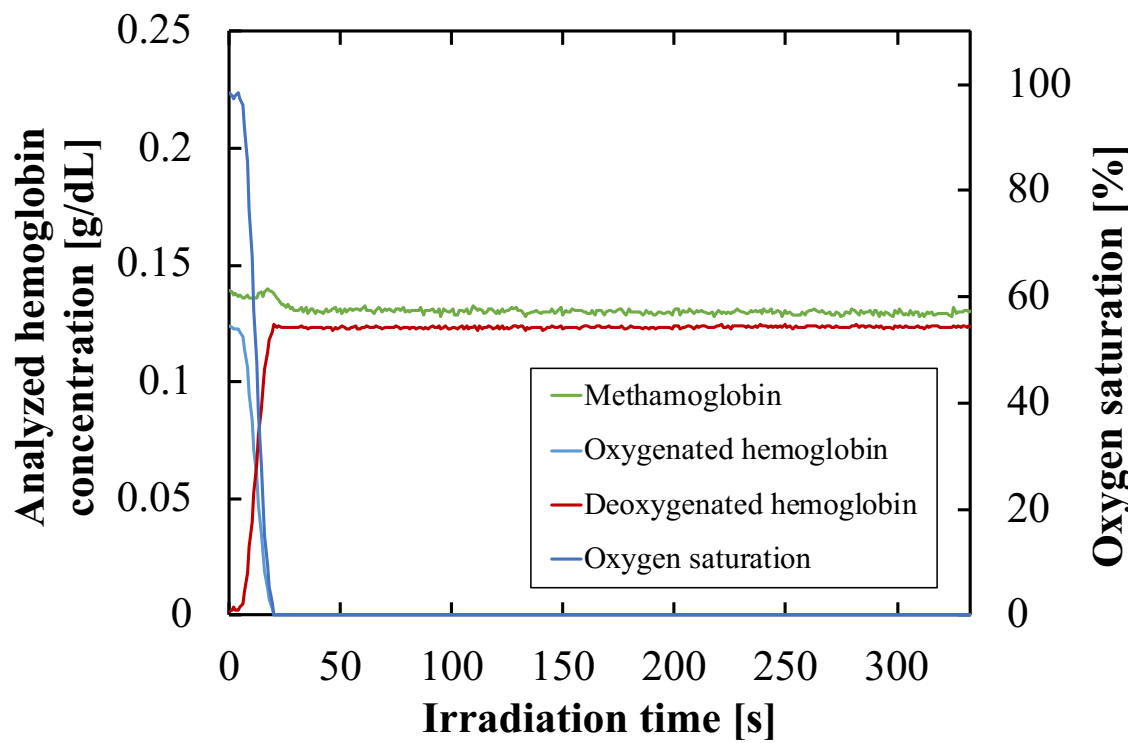
667.8-674.4 nm

(N=1)

19 ms

0.75 nm

1 s



8-7 α

2.1 mg/mL

(N=1)

9 、

9.1、
、 (15-60 min, 2.3.4)

in vitro 9
in vitro

9.2、
5
(i) *in vitro* (ii) *in vivo*

(i)□ *in vitro*
2 0-40 J/cm²

(ii)□ 9 35 J/cm²
von

Willebrand Factor

in vitro
in vitro

in vivo

[1-3]
in vitro *in vivo*

(DLI: Drug Light Interval)
[4] DLI 30 min

[1-3]

in vivo DLI
4 hr 24 hr
[5, 6] MPPa (pyropheophorbide-*a* methyl ester)
(HUVEC)
in vitro 12 h [7]
9-1

5 *in vitro*
DLI *in vivo*

9.3、

A) (7.4.2) (8.3.2)
Q (670 nm) 6-8

3
(7.2.2) 1 80 s
190 s 2 3

6-8
(6.4.3.1) 1

2

3 ()

9-1

9.4、
9.4.1、
2

(6.5) 6-8

1 s
(8.2.2)

³g/dL (8.1) 2.4 4.8+10⁻
4-5

2.4

in vitro

[8]
30 min DLI DLI 4-6 hr
35% 10-100
[8, 9]

9.4.2、 *in vitro*
、 9-1 2

1.38
(B)

(7.2.2)
in vitro [10,
11]

in vitro

9.4.3、
(6-8)

9.4.4、 **Limitation**
(i)□ 9.4.1 2.4
(ii)□9.4.2 *in vitro*

(iii) 9.4.3

9.5、

、

in vivo

in vitro

- [1] B. J. Tromberg, A. Orenstein, S. Kimel, S. J. Barker, J. Hyatt, J. S. Nelson, and M. W. Berns, "In vivo tumor oxygen tension measurements for the evaluation of the efficiency of photodynamic therapy," *Photochem. Photobiol.*, vol. 52, pp. 375-385, 1990.
- [2] W. M. Star, H. P. Marijnissen, A. E. van den Berg-Blok, J. A. Versteeg, K. A. Franken, and H. S. Reinhold, "Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers," *Cancer Res.*, vol. 46, pp. 2532-2540, 1986.
- [3] J. S. Nelson, L. H. Liaw, A. Orenstein, W. G. Roberts, and M. W. Berns, "Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, and phthalocyanine," *J. Natl. Cancer I.*, vol. 80, pp. 1599-1605, 1988.
- [4] B. W. Henderson and T. J. Dougherty, "How does photodynamic therapy work?," *Photochem. Photobiol.*, vol. 55, pp. 145-157, 1992.
- [5] W. J. Moy, S. J. Patel, B. S. Lertsakdadet, R. P. Arora, K. M. Nielsen, K. M. Kelly, and B. Choi, "Preclinical in vivo evaluation of Npe6-mediated photodynamic therapy on normal vasculature," *Lasers in Surg. Med.*, vol. 44, pp. 158-162, 2012.
- [6] K. S. McMahon, T. J. Wieman, P. H. Moore, and V. H. Fingar, "Effects of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 on vessel constriction, vessel leakage, and tumor response," *Cancer Res.*, vol. 54, pp. 5374-5379, 1994.
- [7] Y. Tian, W. Leung, K. Yue, and N. Mak, "Cell death induced by MPPa-PDT in prostate carcinoma in vitro and in vivo," *Biochem. Bioph. Res. Com.*, vol. 348, pp. 413-420, 2006.
- [8] Meiji Seika, , □ 100 mg,
, 2016 6 (10).
- [9] P. Vaupel, F. Kallinowski, and P. Okunieff, "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review," *Cancer Res.*, vol. 49, pp. 6449-6465, 1989.
- [10] M. J. Niedre, A. J. Secord, M. S. Patterson, B. C. Wilson, "In vitro tests of the validity of singlet oxygen luminescence measurements as a dose metric in photodynamic therapy," *Cancer Res.*, vol. 63, pp. 7986-7994, 2003.
- [11] E. Ogawa, A. Ito, and T. Arai, "Detailed in vitro study of the photosensitization reaction of extracellular talaporfin sodium in rat myocardial cells," *Lasers Surg. Med.*, vol. 45, pp. 660-667, 2013.

9-1、		[5-7]	
		PS	DLI
<i>in vitro</i>	HUVEC	NPe6	15 min
<i>in vivo</i>			()
<i>in vivo</i> ^[5]		NPe6	
<i>in vivo</i> ^[6]		NPe6	4, 24 hr
<i>in vitro</i> ^[7]	HUVEC	MPPa	4 hr

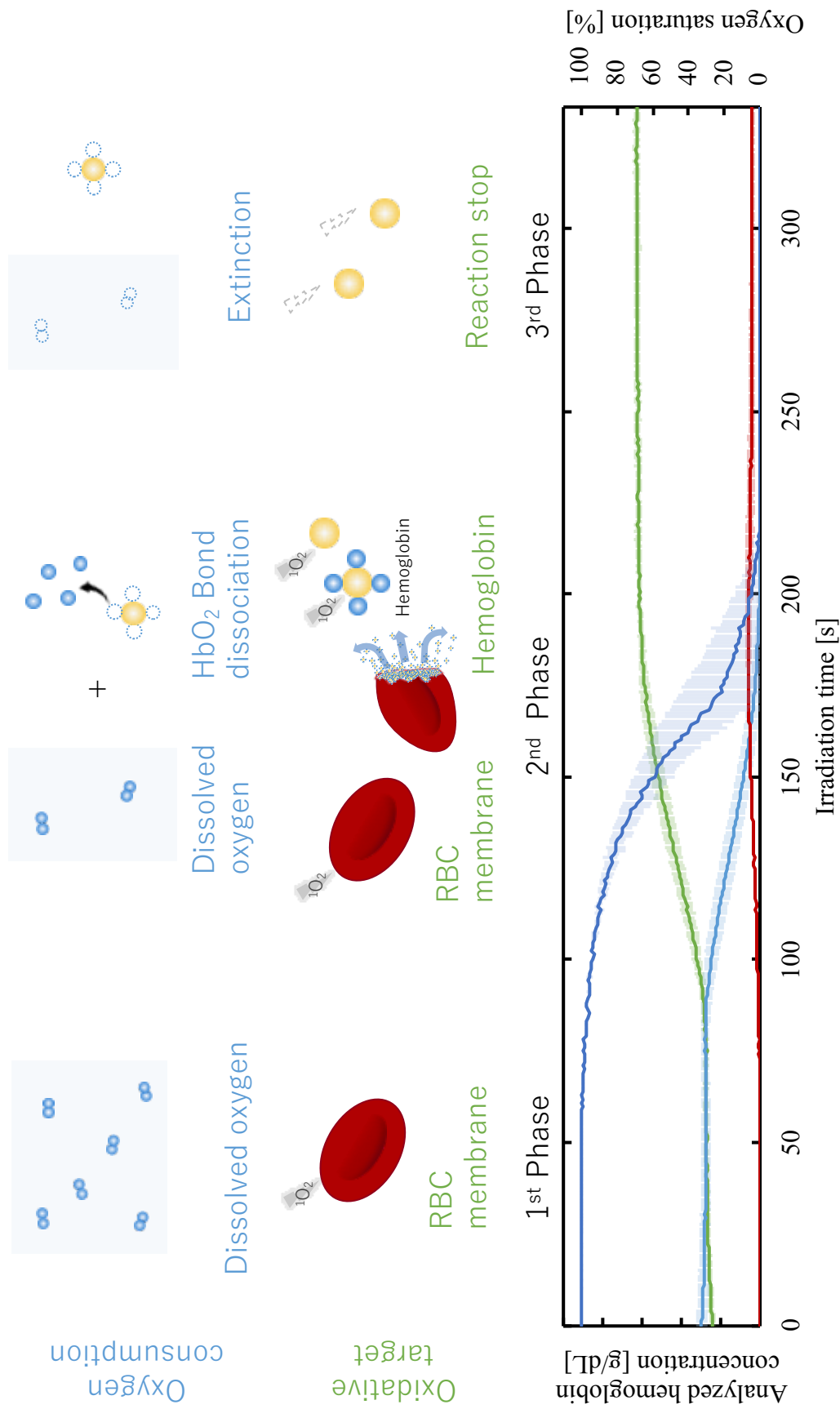


図9-1 提案計測法で明らかになった赤血球混濁液内の反応進行

10 。

(15-60 min, 2.3.4)

in vitro

2

3

in vivo

in vitro

4

5

(i) *in vitro*

(ii) *in vivo*

(i)

2

in vitro

0-40 J/cm²

(ii)

9 35 J/cm²

von Willebrand Factor

(i) (ii)

in vitro

in vitro

6

7

(i)

(ii)

(i)

(ii)

pH

10

in vitro

(

5)

8

9

*in vivo**in vitro**in vitro*

A π

A.1 π

π

Irradiance

Radiant exposure

(International Commission on Illumination; CIE)

[1]

[2, 3]

(Irradiance)

(Radiant

exposure)

SI

[W/cm²]

[J/cm²]

B 生体の光学特性の表示法

吸収係数 μ_a の均一な吸収体に強度 I_0 の単色平行光が入射したとき、入射点からみて進行方向の深さ z における光強度 $I(z)$ は、Lambert-Beerの法則より式 (B.1) で表される。

$$I(z) = I_0 \exp(-\mu_a z) \quad (B.1)$$

不均一な散乱体である生体組織では、生体内の光は吸収に限らず散乱の影響も大きい。散乱とは屈折率の異なる微小な物体で構成されているマクロな物体に対して光が伝搬するときにミクロな反射や屈折により光が散乱する光学現象のことである。光の散乱には、入射光と散乱光で周波数が増加する非弾性散乱と、周波数が増加しない弾性散乱がある。非弾性散乱にはラマン散乱など、弾性散乱にはレイリー散乱やミー散乱がある。散乱体の大きさと照射光の波長によって散乱特性が異なる [4-8]。レイリー散乱は、散乱体を球体とみなしたときにその粒子径が入射光の波長よりも小さい場合に生じ、発生する前方散乱光と後方散乱光の強度は同等である。一方ミー散乱は、散乱体の粒子径が入射光の波長と同等もしくはそれ以上の場合に起こり、前方散乱が支配的である。生体内部を対象とした光学計測には、生体の吸収が比較的小さい波長 0.7-1.5 μm が一般に用いられる。細胞の大きさは 10-100 μm 、ミトコンドリアや核など細胞小器官の大きさは数 100 nm-数 μm なので、生体組織内における散乱は主にミー散乱が生じる [8]。

生体組織内における散乱は、散乱体の大きさや形状によって光子が散乱する角度に強度分布が生じる。散乱の角度分布を表すのが異方性パラメータ g であり、散乱角を θ とすると位相関数 $p(\theta)$ の余弦平均から求められる。

$$g = \langle \cos \theta \rangle = \int_0^\pi p(\theta) \cos \theta \sin \theta d\theta \quad (B.2)$$

$g=1$ のとき完全な前方散乱、 $g=0$ のとき等方散乱、 $g=-1$ のとき完全な後方散乱を示す。生体組織では一般に $g=0.80-0.99$ の強い前方散乱を示すことが知られている [6, 7]。一方、生体は大きさの異なる種々の物体で構成されていることから生体内を伝搬する光は多重散乱が生じ、ミクロに一過程を見ると前方散乱だがマクロに見ると等方散乱に似た状態が観測される [6]。等方散乱とみなせる場合、等価散乱係数 μ_s' は式 (B.3) で定義される。生体組織の散乱特性表示は等価散乱係数が用いられることが多い [4-8]。

$$\mu_s' = (1 - g)\mu_s \quad (B.3)$$

生体組織内の光は、生体組織での吸収や多重散乱を受けることで減衰する。光の吸収と散乱をふまえて両者に関する係数を加算したものが減衰係数 μ_t である。拡散領域における組織内の実効的な減衰係数 μ_{eff} は式 (B.4) で定義される。

$$\mu_{\text{eff}} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s')} \quad (B.4)$$

組織内を伝搬する光が組織内物質に吸収・散乱されて $1/e$ の強度に減衰したときの光の伝搬距離を光侵達長 δ といい、式 (B.5) で定義される。

$$\delta = \frac{1}{\mu_{\text{eff}}}$$

(B.50)

C 本研究結果を用いた生体環境における溶血発生リスクの見積もり

9.4.4 節にて述べた通り本研究は新たな計測法の原理検討を主目的としているため生体での溶血リスクを評価するには至らないが、生体環境を想定したときの溶血発生リスクを簡単に見積る。ここで、光増感反応を用いた心筋組織に対する治療 PD ABLATION® (2.3.4 節参照) に着目する。PD ABLATION® の治療条件として、障害領域の半径 $r = 6.5 \text{ mm}$ 、励起レーザ光照射時間 $T = 10 \text{ min}$ を仮定する。1 つの赤血球が照射を受ける時間 $t \text{ [s]}$ は、照射半径 $r \text{ [mm]}$ および心筋組織の血流速度 $v_{BF} \text{ [mm/s]}$ を用いると以下のように算出できる。

$$t = \frac{2r}{v_{BF}} \quad (\text{C.10})$$

ここで、報告されている心筋組織内の血流速は $v_{BF} = 60 \text{ mm/s}$ [9] であることから、 $t = 0.2 \text{ s}$ である。ここで、図 6-23 に示す提案計測法より得た励起レーザ光照射時間に伴うメトヘモグロビン濃度変化と図 8-2 に示すメトヘモグロビン濃度と溶血度の関係式 (8.1) を用いると $t = 0.2 \text{ s}$ における溶血発生度は 0.08% と見積もられる。さらに、励起レーザ光時間 $T = 10 \text{ min}$ の間に障害領域を通過する血液量 $V_{damaged}$ は、心筋組織の組織血流量 $F \text{ [mL/g/min]}$ 、心筋組織の密度 $\rho \text{ [g/cm}^3\text{]}$ を用いると以下のように算出できる。

$$V_{damaged} = F \times \rho \times \frac{2}{3} \pi (r \times 0.10^3 \times T) \quad (\text{C.20})$$

ここで、報告されている心筋組織の組織血流量は $F = 1 \text{ [mL/g/min]}$ [10]、心筋組織の密度 ρ として 1 g/cm^3 を用いると、 $V_{damaged} = 5.7 \text{ mL}$ と見積もられる。全身血液量は 5 L であることから [11]、全身血液量に対する障害領域を通過する血液量の割合は 0.11% と見積もられる。すなわち、全身血液量の約 0.11% しか励起レーザ光照射を受けず、励起レーザ光照射を受ける赤血球においても溶血が発生するのは 0.08% 程度にしか満たない。厚生労働省が定めている溶血リスク判定表 (表 4-5 参照) より、軽度な溶血は 2% 以上である。これらを踏まえると、現状の PD ABLATION® における溶血リスクは非常に低いと予想する。

- [1] D. H. Sliney, "Radiometric quantities and units used in photobiology and photochemistry: Recommendations of the Commission International de l'Eclairage (International Commission on illumination)," *Photochem. Photobiol.*, vol. 83, pp. 425-432, 2007.
- [2] S. E. Braslavsky, "Glossary of terms used in photochemistry 3rd Edition (IUPAC recommendations 2006)," *Pure Appl. Chem.*, vol. 79, pp. 293-465, 2007.
- [3] E. R. Cohen, T. Cvitas, J. G. Frey, B. Holmstrom, K. Kuchitsu, R. Marquardt, I. Mills, F. Pavese, M. Quack, J. Stohner, H. L. Strauss, M. Takami, and A. J. Thor, , , , : , 2007, pp. 41-47.
- [4] □ , , , , : , 1998, pp. 10-189.
- [5] W. F. Cheong, S. A. Prahl, and A. J. Welch, "A review of the optical properties of biological tissues," *IEEE J. Quantum Electron.*, vol. 26, pp. 2166-2185, 1990.
- [6] M. S. Patterson, B. C. Wilson, and D. R. Wyman, "The propagation of optical radiation in tissue I. Models of radiation transport and their application," *Lasers Med. Sci.*, vol. 6, pp. 155-168, 1991.
- [7] M. S. Patterson, B. C. Wilson, and D. R. Wyman, "The propagation of optical radiation in tissue II. Optical properties of tissues and resulting fluence distributions," *Lasers Med. Sci.*, vol. 6, pp. 379-390, 1991.
- [8] □ , , : : , 2009, pp. 12-21.
- [9] □ J. Rychik and Z. Y. Tian, "Quantitative assessment of myocardial tissue velocities in normal children with Doppler tissue imaging," *Am. J. Cardiol.*, vol. 77, pp. 1254-1257, 1996.
- [10] P. Vaupel, F. Kallinowski, and P. Okunieff, "Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review," *Cancer Res.*, vol. 49, pp. 6449-6465, 1989.
- [11] □ K. T. Patton, and G. A. Thibodeau, , : , 2017, pp. 326-329.

著者論文目録

1 原著論文

1.1 本研究に関連する論文

- (1) R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Phototoxicity of vascular endothelial cells caused by contact with talaporfin sodium for 15–120 min: *in vitro* and *in vivo* studies,” *Photomed. Laser Surg.*, vol. 35, pp. 305-310, 2017.
- (2) R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Oxygen-enriched photosensitizer medium with red blood cells to study tissue interaction of photosensitization reaction,” *Photomed. Laser Surg.*, vol. 36, pp. 146-150, 2018.
- (3) R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Continuous optical monitoring of red blood cells during a photosensitization reaction,” *Photomed. Laser Surg.*, accepted 9 October 2018.

1.2 その他の論文

なし

1.3 国際会議論文（査読付きの full-length papers）

- (1) R. Hamada, R. Matsuzaki, E. Ogawa, and T. Arai, “Patency of heart blood vessels under photosensitization reaction shortly after intravenous injection of talaporfin sodium in canine model,” *Proc. SPIE*, vol. 9706, pp. 97061H1-6, 2016.
- (2) R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Photosensitization reaction induced hemolysis in a cuvette observed with hemoglobin absorption spectrum of various species,” *Proc. SPIE*, vol. 10062, pp. 100620L1-5, 2017.
- (3) R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Continuous optical measurement system of hemolysis during a photosensitization reaction using absorption spectrum,” *Proc. SPIE*, vol. 10492, pp. 104920J1-5, 2018.
- (4) H. Takahashi, R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Mechanism to preserve phrenic nerve function during photosensitization reaction: drug uptake and photosensitization reaction effect on electric propagation,” *Proc. SPIE*, vol. 10476, pp. 1047610-1-5, 2018.

2 学会

2.1 国際会議発表

- (1) R. Hamada, R. Matsuzaki, H. Takenoya, M. Kurotsu, E. Ogawa, and T. Arai, “Acute phase injury of vascular endothelial cells under extra-cellular talaporfin sodium existence: *In vitro*

- study,” *15th IPA World Congress* (Rio de Janeiro, Brazil, 2015.5.25).
- (2) R. Hamada, R. Matsuzaki, E. Ogawa, and T. Arai, “Patency of heart blood vessels under photosensitization reaction shortly after intravenous injection of talaporfin sodium in canine model,” *SPIE BiOS2016* (San Francisco, USA, 2016.2.17).
- (3) R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Photosensitization reaction induced hemolysis in a cuvette observed with hemoglobin absorption spectrum of various species,” *SPIE BiOS2017* (San Francisco, USA, 2016.1.31).
- (4) R. Hamada, E. Ogawa, T. Arai, “Hemolysis by Photosensitization Reaction: Time History Absorption Spectrum Measurement with Time,” *16th IPA World Congress* (Coimbra, Portugal, 2017.6.12).
- (5) R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Continuous optical measurement system of hemolysis during a photosensitization reaction using absorption spectrum,” *SPIE BiOS2018* (San Francisco, USA, 2018.1.30).
- (6) H. Takahashi, R. Hamada, E. Ogawa, and T. Arai, “Mechanism to preserve phrenic nerve function during photosensitization reaction: drug uptake and photosensitization reaction effect on electric propagation,” *SPIE BiOS2018* (San Francisco, USA, 2018.1.29).

2.2 国内学会発表

- (1) 浜田梨沙, 松崎亮太, 片桐渉, 竹ノ谷洋海, 黒津真璃子, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “Talaporfin sodium の細胞外光増感反応による血管内皮細胞障害,” 第54回日本生体医工学会大会(名古屋, 2015.5.9).
- (2) 片桐渉, 浜田梨沙, 竹ノ谷洋海, 黒津真璃子, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “Talaporfin sodium の細胞外光増感反応による末梢神経障害: *in vitro* における検討,” 第54回日本生体医工学会大会(名古屋, 2015.5.9).
- (3) 浜田梨沙, 松崎亮太, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “talaporfin sodium を用いた細胞外光増感反応による急性・亜急性期の血管内皮細胞障害: *in vitro* での検討,” 第25回日本光線力学学会(東京, 2015.7.11).
- (4) 浜田梨沙, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応による溶血現象の光学的経時計測装置: *ex vivo* における検討,” 第55回日本生体医工学会大会(富山, 2016.4.28).
- (5) 浜田梨沙, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “赤血球周囲の talaporfin sodium 濃度が高い状態での光増感反応による溶血現象: *in vitro* での光学的経時計測装置の開発,” 第26回日本光線力学学会(横浜, 2016.6.25).
- (6) 小川恵美悠, 大槻麗奈, 浜田梨沙, 土井万理香, 荒井恒憲, “タラポルフィンナトリウム静注後の組織への薬剤移行連続測定と皮膚光線曝露による紅斑発生: 動物モデルによる検討,” 第26回日本光線力学学会(横浜, 2016.6.25).

- (7) 浜田梨沙, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応による溶血進行調査: *in vitro* における検討,” 第37回日本レーザー医学会(旭川, 2016.10.22).
- (8) 浜田梨沙, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “赤血球及び透過吸収スペクトル分光による酸素環境を考慮した光増感反応 *in vitro* 実験法の提案,” 第56回日本生体医工学会大会(仙台, 2017.5.4).
- (9) 高橋晴香, 浜田梨沙, 小川恵美悠, 荒井恒憲, 神経に対する光増感反応: *ex vivo* での検討, 第56回日本生体医工学会大会(仙台, 2017.5.4).
- (10) 浜田梨沙, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “talaporfin sodium を用いた細胞外光増感反応による赤血球の障害Ⅱ: 溶血現象の光学的経時計測装置,” 第27回日本光線力学学会(京都, 2017.7.14).
- (11) 高橋晴香, 浜田梨沙, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “光増感反応を用いた不整脈治療における神経障害性:*ex vivo* における検討,” 第27回日本光線力学学会(京都, 2017.7.14).
- (12) 浜田梨沙, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “細胞外光増感反応による溶血進行調査:*in vitro* における検討, 第38回日本レーザー医学会,” (横浜, 2017.11.11).
- (13) 高橋晴香, 浜田梨沙, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “PDT による神経障害: 横隔神経保存例を説明する *ex vivo* 実験,” 第38回日本レーザー医学会(横浜, 2017.11.11).
- (14) 添川泰大, 浜田梨沙, 小川恵美悠, 荒井恒憲, “心筋細胞の光増感反応障害: 反応後の障害機構,” レーザー学会学術講演会 第38回年次大会, (京都, 2018.1.24).

3 特許

なし

謝辞

本研究は、著者が慶應義塾大学大学院 理工学研究科基礎理工学専攻 後期博士課程在学中に、同大学理工学部荒井恒憲教授の指導のもとに行ったものである。

本研究を行うにあたり、多くのご指導とご支援を賜りました荒井恒憲教授に心より感謝申し上げます。医工連携・産学連携の一端に携わらせていただき、多くの知見と経験を得ることができました。これまでの5年間、いつも温かいご指導を頂き本当にありがとうございました。

本学位論文をまとめるにあたり、副査としてご指導いただきました田中敏幸先生、塚田孝祐先生、寺川光洋先生、臼田実男先生に深く感謝申し上げます。

慶應義塾大学医学部循環器内科の木村雄弘先生、高月誠二先生には、実験や医学的観点での研究討論に際して、多くのご指導とご支援を賜りました。感謝申し上げます。

株式会社アライ・メッドフoton研究所の皆様には、多くの学びの機会を提供いただきました。感謝申し上げます。

同じ研究グループとして研究に関する討論を行い、多くの場面で支えてくださった、土井万里香さん、巖真帆さん、宇野優子さん、添川泰大さん、高橋晴香さん、中澤春奈さん、また既に社会でご活躍中の荒井研究室卒業生の小川恵美悠さん、高橋芽意さん、黒津真璃子さん、矢島正大さん、森永謙二郎さん、片桐渉さん、大槻麗奈さん、野辺平歩さん、に感謝いたします。これまで荒井研究室での研究生活をともに過ごした全ての先輩方、同期の方、後輩に感謝しています。ありがとうございました。

荒井恒憲教授秘書の鈴木れいさんには、常日頃から温かいご支援とご配慮をいただき、研究生活を支えていただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、5年間の研究生活を送るにあたり、いつもそばで支えてくれた家族に心から感謝しています。

2018 年 12 月 浜田梨沙